

UNIVERSITÉ DE PARIS
ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1912-1913

N° 16

ÉTUDE ANALYTIQUE
DES
LIPOÏDES ET DES MATIÈRES GRASSES
DU SÉRUM SANGUIN

APPLIQUÉE A LA
PHYSIOLOGIE ET A LA PATHOLOGIE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE JUILLET 1913

PAR

Martial LAUDAT

Pharmacien de 1^{re} classe
Ancien préparateur du Cours de Chimie Biologique
à l'École supérieure de Pharmacie
Ancien interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. GRIMBERT, président.
LEBEAU, professeur.
GUERBET, agrégé.

Saint-Amand (Cher). — Typ. BUSSIÈRE.

1913

UNIVERSITÉ DE PARIS
ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1912-1913

N° 16

ÉTUDE ANALYTIQUE
DES
LIPOÏDES ET DES MATIÈRES GRASSES
DU SÉRUM SANGUIN

APPLIQUÉE A LA
PHYSIOLOGIE ET A LA PATHOLOGIE

THÈSE

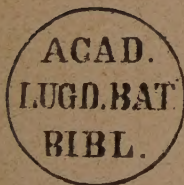
POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE JUILLET 1913

PAR

Martial LAUDAT

Pharmacien de 1^{re} classe
Ancien préparateur du Cours de Chimie Biologique
à l'École supérieure de Pharmacie
Ancien interne des Hôpitaux de Paris



JURY { MM. GRIMBERT, président.
LEBEAU, professeur.
GUERBET, agrégé.

Saint-Amand (Cher). — Typ. BUSSIÈRE.

1913

PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GAUTIER, Directeur, *, Q I.
BOURQUELOT, Assesseur, *, Q I.
E. MUSSON, Secrétaire, *, Q I.

PROFESSEURS

MM. GUIGNARD, Membre de l'Institut,	
O. *, Q I	Botanique générale.
VILLIERS, *, Q I	Chimie analytique.
BOURQUELOT, *, Q I	Pharmacie galénique.
GAUTIER, *, Q I	Chimie minérale.
RADAIS, *, Q I	Cryptogamie.
BÉHAL, O. *, Q I	Chimie organique.
PERROT, *, Q I	Matière médicale.
COUTIÈRE, *, Q I	Zoologie.
BERTHELOT, Q I	Physique.
GRIMBERT, *, Q I	Chimie biologique.
MOUREU, Membre de l'Institut,	
*, Q I	Pharmacie chimique.
LEBEAU, Q I	Toxicologie.
DELÉPINE, Q I	Minéralogie et Hydrologie.

Directeur honoraire : M. GUIGNARD, O. *, Q I.

Professeurs honoraires : MM. JUNGFLEISCH, O. *, Q I. et BOUCHARDAT, O. *, Q I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. GUERBET, Q I.		MM. GUÉRIN, Q I.
VALEUR, Q A.		GUÉGUEN, Q I.
BOUGAULT, Q I.		LUTZ, Q I.
TASSILLY, Q I.		HÉRISSEY, Q I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, Q I	Chimie générale.
COUSIN, Q I	Chimie analytique.
SOUÈGES, Q A	Micrographie.
MOURLOT, Q I	Physique.
BARTHELAT, Q I	Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. JAVILLIER, Q A.

Bibliothécaire en chef : M. DORVEAUX, Q I.

A

LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

MON PREMIER MAÎTRE EN PHARMACIE

A MA MÈRE

A

M. LE PROFESSEUR L. GRIMBERT

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

PROFESSEUR A L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

PHARMACIEN EN CHEF DES HÔPITAUX DE PARIS

DIRECTEUR DE LA PHARMACIE CENTRALE DES HÔPITAUX

*Hommage de reconnaissance
et de respectueux attachement.*

A

M. LE PROFESSEUR F. WIDAL

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
MÉDECIN DE L'HÔPITAL COCHIN

Hommage de respectueuse gratitude.

INTRODUCTION

Pendant nos années d'internat passées dans le service de M. le Professeur Widal, nous avons eu à peu près chaque jour l'occasion d'examiner le sang prélevé chez des malades atteints d'affections les plus diverses. Notre attention fut particulièrement attirée par l'opalescence ou même la lactescence que présentaient fréquemment certains sérums.

Ces caractères avaient été signalés par les anciens auteurs chez les brightiques et les diabétiques. MM. Widal et Sicard (1), en 1896, rappelèrent de nouveau l'attention sur eux, et M. Jousset (2) en 1901, mettant hors de cause les matières albuminoïdes, les attribua définitivement à la lipémie c'est-à-dire à la présence en excès des graisses et des lipoïdes dans le sang.

Nos premières recherches dans la littérature chimique

(1) F. Widal et A. Sicard, « Opalescence et lactescence du sérum de certains albuminuriques (*Bull. et mém. de la soc. méd. des hôp. de Paris*, 6 nov. 1896, p. 766 et *Semaine médicale*, 1896, 456).

(2) A. Jousset, Des humeurs opalescentes de l'organisme. *Thèse de Paris*, 1901).

ou médicale, ne nous ayant pas fait rencontrer de méthode rigoureuse et complète pour l'étude détaillée de cette question, nous avons pensé qu'il y aurait une réelle utilité à combler cette lacune.

Ces considérations marquèrent le début de notre travail. Depuis, l'attention s'est portée chaque jour davantage sur les lipoides; on a voulu s'en servir pour expliquer la plupart des phénomènes biologiques récemment découverts. Mais les méthodes usuelles d'analyse n'étaient pas adaptées à des recherches si délicates, et souvent le succès n'a pas répondu aux prévisions.

Dans l'ordre médical, les importants travaux de M. Chauffard et de ses collaborateurs sur la cholestérine, ont montré tout l'intérêt qu'il pouvait y avoir à suivre les variations des graisses et des lipoides du sang au cours des maladies.

Tous ces faits n'ont donc pu que nous encourager à persévérer dans nos recherches, et si ce travail, commencé à la fin de l'année 1909, ne paraît qu'aujourd'hui, c'est que nous avons tenu d'abord à déterminer la valeur des techniques proposées jusqu'ici. Puis, comme aucune ne répondait à notre but, nous avons cherché, en nous basant sur les acquisitions de nos devanciers, à obtenir une méthode exacte et aussi simple que pouvait le permettre l'étendue d'un tel sujet.

Nous croyons avoir réalisé notre projet. Les expériences, de contrôle auxquelles nous nous sommes d'abord livrés, puis les recherches effectuées sur plusieurs centaines de malades, nous permettent d'espérer, que les déductions que nous en avons tirées aux points de vue physiologique et pathologique, reposent sur des bases sérieusement établies.

Dans un premier chapitre, nous résumons brièvement les travaux qui ont porté sur les graisses du sang, depuis leur découverte jusqu'à notre époque. Ce sera l'historique de la question et nous ne reviendrons pas sur les méthodes qui ont servi à ces recherches.

Nous examinerons ensuite, ce qui a été proposé durant environ les dix dernières années à propos des graisses, de la cholestérine libre ou éthérifiée, et des lipoïdes phosphorés. A chaque corps correspond un chapitre particulier dans lequel les techniques sont résumées et discutées très rapidement.

Dans le sixième chapitre, après avoir relaté comment nous sommes peu à peu arrivés à établir notre méthode, nous exposons celle-ci en insistant sur les petits détails pour faciliter sa vérification et son emploi.

Nous résumons ensuite en quelques pages, les résultats qu'elle nous a permis d'obtenir dans le domaine de la physiologie ou de la pathologie.

Enfin, nos conclusions font ressortir ce que nous croyons avoir acquis de nouveau au point de vue de l'analyse quantitative et de ses applications.

Ce travail a été exécuté dans le laboratoire et sous la direction de M. le Professeur Grimbert. Pendant les quatre années passées auprès de lui comme élève, puis comme préparateur du cours de Chimie biologique, nous avons pu apprécier ce que l'on peut attendre de sa bonté et de son expérience, nous lui exprimons toute notre reconnaissance et notre respectueux attachement.

M. le Professeur Widai a bien voulu pendant notre internat nous confier les recherches chimiques de son labo-

ratoire et nous associer à ses travaux personnels. Nous lui offrons l'expression de notre profonde gratitude.

Nous remercions également M. Cousin, pharmacien en chef de l'hôpital Cochin, de la grande bienveillance qu'il nous a toujours montrée et des conseils qu'il a bien voulu nous donner pour ce travail.

CHAPITRE PREMIER

PREMIERS ESSAIS SUR LA RECHERCHE ET L'ANALYSE DES MATIÈRES GRASSES DU SANG

D'après Gobley, Hunter et Schwilgué (1) paraissent avoir signalé les premiers l'existence de matière grasse dans le sang. Elle devait être, présumaient-ils, analogue à celle de la substance nerveuse.

En 1813, Berzélius (2) constate la présence d'un corps gras, mais il le croit formé sous l'influence de l'alcool et de l'éther qu'il emploie pour l'obtenir. Chevreul (3) démontre qu'il préexiste dans le sang. En 1823, il l'extrait de la fibrine. Très voisin de la graisse du cerveau, il peut cristalliser, contient du phosphore, s'émulsionne dans l'eau et peut donner des produits ammoniacaux.

En 1826 (4), Morin dose 0 gr. 30 0/0 de matière huileuse dans le sang épanché dans la poitrine d'un malade à la suite d'une rupture d'anévrisme.

(1) Hunter et Schwilgué, cité dans le mémoire de Gobley, J. P. C. t. XXI, p. 249, 1852.

(2) Berzélius, *Annales de chimie*, t. LXXXVIII, p. 26.

(3) Chevreul, *Annales du Muséum d'histoire naturelle*, 1823.

(4) Morin, J. P. C. t. XII, p. 248, 1826.

En 1828 (1), Caventou étudiant un « sang blanc » ne s'occupe pas des graisses et cependant il démontre que l'albumine n'est pas la cause de cet aspect.

En 1831 (2), Le Canu, par épuisement du sang à l'aide de l'alcool et reprise de l'extrait alcoolique par l'éther, isole une matière grasse cristallisable nacrée, fondant vers 150° et présentant de nombreuses analogies avec la cholestérine. Elle est identique à la matière grasse du cerveau décrite par Chevreul. D'autre part, il obtient « un produit huileux, non phosphoré, qui, sous l'action de la potasse, devient acide ».

L'analyse de deux sangs lui donne les résultats suivants :

Matière grasse cristallisable	1 gr. 20	2 gr. 10
» huileuse	1 gr. 00	1 gr. 30

La même année, Denis (3) extrait du sang deux graisses phosphorées, une blanche et une rouge, et quelquefois aussi de la cholestérine.

Le Canu (4), rapporteur du mémoire de Denis à la Société de Pharmacie, montre que ces deux graisses phosphorées sont identiques et correspondent à celles de Chevreul et de Vauquelin. Pour la cholestérine, il fait remarquer que l'auteur est trop imprécis sur la façon dont il a opéré pour la séparer et l'identifier.

A la même époque, au cours de l'analyse du sang d'un ictérique, Le Canu (5) obtient un volumineux extrait

(1) Caventou, J. P. C. t. XIV, p. 627, 1828.

(2) Le Canu, J. P. C. t. XVII, p. 485-545, 1831.

(3) Denis, *Recherches expérimentales sur le sang humain*, 1830.

(4) Le Canu, J. P. C. t. XVII, p. 485, 1831, *id.*, p. 522 et p. 545.

(5) Le Canu, J. P. C, t. XVII, p. 558, 1831.

éthéré ; la matière grasse cristallisable y est très abondante.

En 1833 (1), Berzélius isole de la fibrine de bœuf une matière grasse, soluble dans l'alcool, acide et non phosphorée, identique aux acides gras.

Boudet (2), après avoir traité le sérum desséché par l'alcool bouillant, remarque que pendant le refroidissement il se dépose des flocons blancs nacrés. Il les isole et obtient un produit neutre, fondant à 36°, facilement soluble dans l'éther, difficilement soluble dans l'alcool froid, et donnant avec l'acide sulfurique une coloration rouge, comme la cholestérine. Il le regarde comme un corps nouveau et l'appelle « séroline ». D'autre part, sous la direction de Chevreul, il identifie la cholestérine du sang avec celle du cerveau. Il obtient également la graisse phosphorée cristallisable et signale en plus la présence d'un savon alcalin, formé probablement par les acides oléique et margarique. Enfin, il conclut que la matière huileuse de Le Canu correspond au savon alcalin, à la cholestérine et à la séroline.

En 1833, Le Canu (3) trouve 117 grammes 0/00 de corps gras dans un sang laiteux, et en plus du savon alcalin et de la cholestérine, il en isole de d'oléine, de la margarine et de la stéarine qui ne se trouvent pas dans le sang normal.

En 1837, le même auteur (4) signale la présence dans le sérum d'acides oléique et margarique libres, mais constate l'absence de matière grasse phosphorée.

(1) Berzélius, *Traité de chimie*, t. VII.

(2) Boudet, J. P. C. t. XIX, p. 291, 1833.

(3) Le Canu, J. P. C. t. XXI, p. 284, 1835.

(4) Le Canu, *Thèse sur le sang humain*, 1837, p. 45 et J. P. C. t. XXIV, p. 38, 1858. *Analyse de Planche*.

En 1839 Denis (1), donne comme éléments de la matière grasse du sang normal : la cholestérine, la séroline, la cérébrine ou graisse phosphorée, les acides oléique, margarique et un acide volatil innommé, ces acides étant partiellement saturés par la soude.

Andral et Gavarret (2), dans leurs recherches sur les sangs pathologiques, ne mentionnent pas les graisses.

En 1842, Personne et Deville (3), dans l'analyse du sang laiteux d'un goutteux, obtiennent 5 à 6 grammes d'extrait éthéré pour 60 grammes de sérum. Il est constitué par de l'oléine et de la margarine.

En 1844, Figuier (4), dans son étude sur les globules rouges, ne parle pas de matières grasses.

Becquerel et Rhodier (5) publient la même année leurs recherches sur la composition du sang normal et pathologique. Parmi leurs nombreuses et intéressantes analyses, retenons seulement, la composition des matières grasses du sérum normal :

Matières grasses 1 gr. 60 $\frac{0}{100}$	{ séroline	0,020
	{ matière grasse phosphorée. . .	0,488
	{ cholestérine	0,080
	{ savons.	1,004

Poggiale et Marchal (6), en 1848, trouvent respective-

(1) Denis, *Essai sur l'application de la chimie à l'étude physiologique du sang humain*, 1838. Rapport de Le Canu à la Société de Pharmacie de Paris, t. XXV, p. 224, 1839.

(2) Andral et Gavaret, J. P. C. t. XXVI, p. 582, 1840.

(3) Personne et Deville, J. P. C. t. II, p. 213, 1842.

(4) Figuier, J. P. C. t. VI, p. 304, 1844.

(5) Becquerel et Rhodier, *Recherches sur la composition du sang dans l'état de santé et de maladie*, Paris, 1844.

(6) Poggiale et Marchal, J. P. C. t. XIV, p. 363, 1848. Poggiale, t. XIII. p. 150, 1848.

ment dans le sang artériel ou veineux 1 gr. 10 ou 1 gr. 20 de matières grasses par litre de sérum.

En 1851, Gorup-Besanez (1) compare les principales méthodes usitées pour l'analyse du sang (Prévost et Dumas, Becquerel et Rhodier, Figuier, Schérer et Höple), mais il donne peu de renseignements sur les matières grasses.

Peu après, Verdeil et Marcet (2) proposent une technique modifiée pour l'analyse du sang.

En 1852, nous trouvons avec Gobley (3) un travail important qui, selon l'expression de l'auteur, va coordonner et préciser les divers résultats de ses prédécesseurs. La substance grasse du sang se compose d'oléine, de margarine, de cholestérine, de lécithine et de cérébrine. Pour l'obtenir, il épuise directement le sang par l'éther, le résidu est ensuite desséché et traité à plusieurs reprises par l'alcool bouillant. Il conclut de ses expériences qu'il n'existe pas dans le sang d'acides gras libres ou combinés ; la séroline est un corps complexe, probablement un mélange d'oléine, de margarine et de cholestérine ; la cholestérine est la seule substance cristallisable du sang, elle est identique à celle du jaune d'œuf et à celle des calculs biliaires. La matière grasse phosphorée ou lécithine ne cristallise pas, elle fournit par décomposition des acides margarique, oléique et glycérphosphorique. La cérébrine, substance azotée, se trouve également dans l'œuf et se gonfle dans l'eau comme l'amidon. La putréfaction des graisses du sang fournit des acides oléique et

(1) Gorup-Besanez, J. P. C. t. XIX, p. 69, 1851.

(2) Verdeil et Marcet, J. P. C. t. XX, p. 89, 1851.

(3) Gobley, J. P. C. t. XXI, p. 241, 1852.

margarique. Enfin, la graisse du sang de bœuf est identique à celle du sang humain.

Toutes les conclusions de Gobley ne sont pas exactes, mais on peut dire qu'il a vraiment mis au point cette question des graisses du sang. Nous allons voir, d'ailleurs, que durant les années suivantes, on ne fera, après de nouvelles erreurs, qu'améliorer les procédés de dosage de l'auteur et ce n'est que bien lentement qu'on arrivera à préciser l'identité des divers composants de l'extrait éthéré.

Egalement en 1852, Lehmann (1) analyse le sang des veines porte et sus-hépatique et trouve une plus grande quantité de substances grasses dans la première.

En 1854, paraît le traité de Chimie pathologique de Becquerel et Rhodier (2) qui reproduit presque intégralement, à propos des matières grasses du sang, les termes de leur mémoire de 1844.

En 1857, Hoppe-Seyler (3), à propos du dosage de la fibrine dans le sang, donne une analyse de sérum de cheval où figure seulement le chiffre total des graisses (0,123 0/0).

En 1866 (4), il s'occupe de l'existence de la cholestérine et du protagon dans les globules rouges. Liebreich (5) vient, en effet, de découvrir le protagon dans le cerveau l'année précédente, et conclut à la fin de son travail que

(1) Lehmann, J. P. C. t. XXI, p. 396, 1852.

(2) Becquerel et Rhodier, *Traité de chimie pathologique appliquée à la médecine pratique*, Paris, 1854.

(3) Hoppe-Seyler, *Virchow Archiv.*, XII, p. 480-481, 1857.

(4) Hoppe-Seyler, *Med. Chem. Untersuchungen*, 1866-71, p. 133 à 150, 169 à 208, 366 à 385, 523 à 550.

(5) Liebreich, *Deutsch. Naturl. Bericht*, XXXIX, 1864, p. 88 ; *Annal. Chem. Pharm.*, CXXXIV, 1865, p. 29-44.

ce corps doit être très répandu dans l'économie animale, et que là, où l'on a parlé de graisse phosphorée, il faut penser au protagon.

Hoppe-Seyler isole donc ces deux corps des globules d'oies engraisées et du sang d'un leucémique ; sa méthode d'extraction se rapproche de celle de Gobley puisqu'il épuise les globules par l'éther, mais au lieu de séparer ensuite la cholestérine des graisses phosphorées (lécithine ou protagon) à l'aide de l'huile d'amandes douces comme Gobley, il emploie la saponification par la potasse alcoolique. Il obtient ainsi la cholestérine relativement pure, et il évalue le protagon par un dosage de phosphore (minéralisation au salpêtre, passage par le molybdate et pesée à l'état de pyrophosphate).

Il conclut de ses analyses, que les globules possèdent une quantité de cholestérine et de protagon assez constante et qu'ils ne renferment pas de graisses ; dans le sérum, au contraire, la cholestérine et le protagon varient beaucoup et il y a parfois de très fortes quantités de graisses. Il remarque que les variations de la cholestérine du sérum sont parallèles à celles des graisses. Il note enfin que ses dosages de protagon peuvent n'être pas très exacts.

L'année suivante, Hoppe-Seyler (1) poursuivant ses recherches sur le sang ne parle plus de protagon, mais d'une substance phosphorée organique soluble dans l'éther. Elle n'est pas enlevée complètement par les épuisements du sang à l'éther comme la cholestérine, et il en reste une partie retenue par les matières protéiques. C'est pourquoi l'auteur va modifier sa méthode d'extraction, et la troisième édition de son traité de chimie renferme la

(1) Hoppe-Seyler, *Med. Chem. Untersuchungen* (*loc. cit.*, p. 10).

technique à laquelle il s'est arrêté. Abandonnant définitivement le protagon, il ne mentionne plus dans ses analyses que des dosages de lécithine (Jüdel (1) : analyses de globules humains ; Hoppe-Seyler (2) : composition des globules du hérisson, de la couleuvre).

En 1869 (3), il publie les résultats d'examen de sang dans la chylurie. Comme dans ses recherches précédentes, il constate l'absence de graisse dans les globules alors que le sérum en renferme une notable proportion.

La quatrième édition de son traité, traduite en français par Schlagdenhaufen (4), mentionne à propos de l'analyse des liquides séreux une modification pour le dosage des graisses. Le liquide est d'abord traité par l'alcool, puis ensuite par l'éther ; les extraits, réunis et séchés, sont repris une dernière fois par l'éther. La suite des opérations n'a pas été modifiée. Notons en passant une curieuse note du traducteur, dans laquelle il explique qu'il n'a pas reproduit les tableaux d'analyse de l'auteur, car malgré la valeur de la méthode, son emploi est très délicat et sujet à de nombreuses erreurs, quelle que soit l'habileté de l'opérateur.

Commaille (5), en 1875, indique la saponification comme un moyen rapide et sûr pour la séparation de la cholestérine des graisses.

(1) Jüdel, *Med. Chem. Untersuchungen*, 1866-1871, p. 386-390.

(2) Hoppe-Seyler, *Med. Chem. Untersuchungen*, 1866-1871, p. 391-393, 394-395.

(3) Hoppe-Seyler, *Med. Chem. Untersuchungen*, 1866-1871, p. 551-559.

(4) Hoppe-Seyler, *Traité d'analyse chimique appliquée à la physiologie et à la pathologie*, 4^e édition allemande traduite par F. Schlagdenhaufen, Paris, 1877.

(5) Commaille, *J. P. C.* t. XXII, p. 442, 1875.

Bunge (1) donne, en 1876, une méthode pour l'analyse quantitative du sang, mais les graisses ne sont pas mentionnées.

Durant les années suivantes, la méthode d'Hoppe-Seyler va être presque toujours employée dans les recherches sur le sang, et quand nous la retrouverons, en 1909, dans la dernière édition de son traité (2), nous verrons qu'elle n'a pas subi de modifications essentielles.

En 1877, Drosdoff (3), étudiant la teneur en graisses du sang de la veine porte et des veines hépatiques, conclut à la formation de cholestérine et de lécithine dans le foie.

Puis Freund et Obermayer (4) apportent les résultats de l'analyse du sang d'un leucémique, et Hoppe-Seyler (4 bis) d'un mélanosarcome.

Enfin, Abderhalden (5) a établi ses tableaux de composition du sang des diverses espèces animales, toujours d'après la méthode d'Hoppe-Seyler, en y ajoutant les acides gras libérés de leurs combinaisons alcalines.

Cette question des savons avait déjà suscité bien des controverses. Dès 1874, Röhrig (6) niait leur existence ; Zawilski (7) et Lebedeff (8) confirmèrent dans la suite

(1) Bunge, *Zeitschr. f. Biologie*, **12**, 191 à 216, 1876.

(2) Hoppe-Seyler, *Handbuch. der physiologisch, und. pathologisch chemischen analyse*, bearbeitet von Thierfelder, 8^e édit., 1909.

(3) Drosdoff, *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **1**, 233-243.

(4) Freund et Obermayer, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **15**, 310-318.

(4 bis) Hoppe-Seyler, *Zeitschr. f. physiol. chem.* **15**, 179 à 188.

(5) Abderhalden, *Zeitsch. f. phys. Chemie.*, **23**, 521-531 1897 ; **25**, 65 à 115, 1898.

(6) Röhrig, C. Ludwig, *Arbeiten aus den physiologischen Anstalt zu Leipzig*, **9**, 1874, p. 1.

(7) Zawilsky, *Arbeiten aus den physiologischen Anstalt zu Leipzig*, **11**, 1876, p. 147.

(8) Lebedeff, *Archiv. für Anatomie und physiologie* (physiologische Abtheilung) 1883, p. 488.

cette opinion. En 1884, Hoppe-Seyler (1) reprit la question et démontra que les savons existaient réellement dans le sang ; il proposa même une technique pour les extraire et exposa les résultats qu'il avait obtenus sur le sang d'homme et d'animaux.

Dans le travail mentionné ci-dessus, Lebedeff avait critiqué la méthode proposée par Hoppe-Seyler (2) dans la 5^e édition de son traité, pour la séparation des acides gras des graisses neutres. Hoppe-Seyler (3) répondit à Lebedeff, que son traitement par le carbonate de soude fait avec précaution (au-dessous de 50°) ne pouvait attaquer les graisses neutres. Cependant, cette opération ne figure plus dans la dernière édition du traité.

Enfin, Hürtle (4), en 1896, annonça la découverte dans le sérum de cholestérine à l'état d'éthers oléique et palmitique. Ces éthers correspondent à la séroline de Boudet, dont Gobley avait déjà indiqué d'une façon satisfaisante la composition, en la regardant comme un mélange de cholestérine, d'oléine et de margarine.

Puis Letsche (5), en 1907, montra que la cholestérine existait aussi à l'état libre dans le sérum.

Nous sommes ainsi arrivés peu à peu jusqu'à l'époque actuelle, bien que notre intention, au début de ce chapitre, fut d'étudier seulement ce qui ne gardait qu'un intérêt historique. Cependant, nous avons voulu, en même

(1) Hoppe-Seyler, *Zeitsch. für physiol. chemie*, **8**, 1884, p. 503.

(2) Hoppe-Seyler, *Handbuch der physiologisch. chemischen Analyse*, 5^e Auflage, p. 114.

(3) Hoppe-Seyler, *Zeitsch. f. physiol. chem.*, **8**, 1884, p. 507.

(4) Hürtle, *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, t. XXI, p. 331, 1896.

(5) Letsche, *Zeitsch. f. physiol. Chemie*, t. LIII, p. 31-112, 1907.

temps, comprendre tout ce qui se rapportait à la découverte des constituants de l'extrait éthéré.

Nous considérons notre but atteint, car nous laissons volontairement de côté l'étude de corps, tels que le protagon, la jécorine ou la myéline, dont l'existence dans le sang, ne paraît pas suffisamment établie.

Nous regarderons donc comme éléments de la matière grasse du sérum sanguin susceptibles d'être isolés et dosés : les graisses neutres, les acides gras libres ou à l'état de savons, les lipoïdes phosphorés solubles dans l'éther, la cholestérine libre ou éthérifiée.

Dans les chapitres suivants, après avoir brièvement rappelé ce que nous savons sur la nature de ces corps et sur leurs propriétés, nous exposerons et discuterons les méthodes qui ont été proposées et sont usuellement employées pour leur extraction quantitative.

CHAPITRE II

NATURE ET PROPRIÉTÉS DES GRAISSES ET DES LIPOÏDES

Les graisses, qui existent dans le sang, y sont à l'état de graisses neutres, d'acides gras libres et de savons.

Les acides palmitique, stéarique et oléique forment la base de ces combinaisons. A côté d'eux, et en moins grande quantité, se trouvent les acides volatils.

Si la nature et les proportions des composants de ces mélanges, varient un peu avec les diverses parties de l'économie où on les rencontre, les propriétés chimiques restent cependant les mêmes et sont celles des éthers de la glycérine en général : solubilité dans les solvants organiques, dédoublement par les alcalis avec formation de savons, dédoublement par les ferments (lipase), etc. Les acides gras et les savons que l'on peut trouver dans le sang sont les témoins de ces réactions.

Nous n'insisterons pas sur la détermination, la séparation et le dosage des acides gras supérieurs ou inférieurs, car dans notre travail, nous n'avons pas été amenés à ces précisions analytiques, en raison des très faibles quantités de produits que pouvait nous fournir notre prise d'essai habituelle.

On trouve ensuite des glycérides dans la molécule desquels il rentre un groupement phosphoré : ce sont les phosphatides. Ils sont caractérisés par leur solubilité dans les solvants organiques, par leurs combinaisons avec les chlorures de platine et de cadmium, leur oxydation rapide en solution éthérée. Par ébullition avec de l'eau de baryte, ils se décomposent en acides gras libres, en une base (qui souvent est la choline) et en acide glycérophosphorique.

On les classe, d'après Thudicum (1), selon la teneur en azote et en phosphore de leur molécule, en mono-amino-phosphatides, monoamino-diphosphatides, diamino-phosphatides, triamino-phosphatides, etc.

À côté des phosphatides, il convient de placer le protagon qui, sous l'action de l'eau de baryte, donne les mêmes produits de dédoublement et en plus des cérébro-sides. Ces derniers corps ne sont plus phosphorés et, par hydrolyse, ils fournissent du galactose.

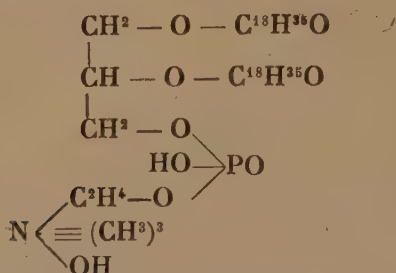
Nous n'étudierons qu'un représentant des phosphatides : le groupe des lécithines, car seule leur existence paraît à peu près admise dans le sang.

Les lécithines sont des éthers de la glycérine, dans lesquels on trouve deux fonctions alcool éthérifiées par deux restes d'acides gras (palmitique, stéarique, oléique ou même linoléique (Cousin) (2) ; la troisième est fixée à une molécule d'acide phosphorique, qui elle-même, est combinée, à la façon d'un éther, à une molécule d'une base quaternaire, la choline en général.

(1) Thudicum, *Zeitsch. f. physiol. Chemie.*, **51**, 71, 1907.

(2) Cousin, J. P. C. (6) **18**, 102 (1903) et **23**-225 (1906).

La lécithine que nous rencontrons le plus fréquemment dans l'organisme est la distéaryllécithine ;



C'est elle que nous aurons toujours en vue, lorsque, dosant le phosphore des lipoides phosphorés, nous l'exprimerons en lécithine.

On extrait généralement les lécithines du jaune d'œuf. Ce sont des substances jaunâtres, hygroscopiques, très difficilement cristallisables, insolubles dans l'eau avec laquelle elles donnent des émulsions crémeuses colloïdales.

Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, l'éther de pétrole, peu solubles dans l'acétate de méthyle. La chaleur les décompose et elles fixent de l'iode par addition.

En solution éthéro-alcoolique, elles sont précipitées par une solution alcoolique de chlorure de cadmium. La combinaison est un peu soluble dans l'alcool et dans l'éther (1). En solution alcoolique, elles donnent avec le chlorure de platine un précipité jaune, floconneux, peu stable, analysé par Strecker (2).

D'après Thudicum, ces réactions sont communes aux autres phosphatides (3).

(1) Bergell, *Berichte der deutsch. chem. Gesellsch.*, **XXXII**, 25-84.

(2) Strecker, *Liebigs annalen*, **148**, 77.

(3) Thudicum (*loc. cit.*, p. 17).

Les lécithines à acide oléique donnent la réaction de Pettenkofer. Leur solution est dextrogyre, mais devient inactive par chauffage à 100°. Elles présentent le phénomène de la biréfringence, ce qui les différencie des graisses (1).

Dans l'hydrolyse par l'eau de baryte ou les alcalis, on obtient de la choline, de l'acide glycérophosphorique et des acides gras à l'état de sel de baryte.

L'ébullition avec les acides minéraux étendus dédouble la lécithine et saponifie même l'acide glycérophosphorique. Par action du suc pancréatique, on obtient des acides gras, de l'acide glycérophosphorique et de la choline.

Enfin, au point de vue biologique, la lécitine possède la propriété d'activer les toxines (2) et les venins (3). Le venin de cobra, par exemple, n'exerce par lui-même aucune action hémolytique ; si on lui ajoute du sérum sanguin ou une petite quantité d'émulsion aqueuse de lécitine, on voit aussitôt se produire une hémolyse intense (4).

Il nous reste à étudier les lipoides non phosphorés. Parmi eux nous ne retiendrons que la cholestérine dont la présence dans le sang est seule bien établie.

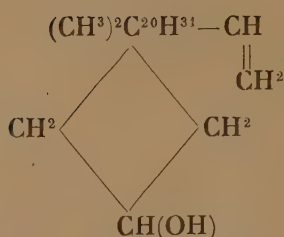
La cholestérine est un terpène secondaire dont la formule stéréochimique n'est pas encore connue d'une façon certaine. Sa formule brute est $C^{27}H^{46}O$ et les recherches de Windaus sur sa constitution l'ont conduit à la représenter ainsi :

(1) Dastre et Morat, Thèse de Dastre, *Sciences nat.*, Paris, 1876.

(2) Flexner, Noguchi, Tallqvist.

(3) Kyes, Morgenroth et Carpi, Kyes et Sachs.

(4) Kyes.



On l'extrait des calculs biliaires et du cerveau. Elle cristallise par refroidissement de ses solutions alcooliques en tables rhombiques renfermant une molécule d'eau. Par évaporation de ses solutions éthérées ou chloroformiques, on obtient des aiguilles soyeuses très blanches qui ne contiennent pas d'eau de cristallisation.

Elle est complètement insoluble dans l'eau, dans les acides étendus et les alcalis même concentrés. Presque insoluble dans l'alcool froid, elle se dissout très abondamment dans l'alcool bouillant, l'éther, le chloroforme, la benzine, l'éther acétique. Les solutions de sels biliaires ou de savons en dissolvent une petite quantité. Elle fond entre $+ 145^\circ$ et 147° ; son pouvoir rotatoire en solution éthérée est lévogyre :

$$= - 31^\circ,59 \text{ (1).}$$

Elle possède de nombreuses réactions qui permettent de l'identifier même en solutions très diluées.

Réaction de Windaus (2) : La cholestérine, en solution éthérée, donne avec une solution de brome dans l'acide acétique (5 grammes de brome pour 100 grammes d'acide acétique), de longs cristaux de cholestérine dibromée : $124^\circ-125^\circ$

(1) Lindenmayer, *Journ. f. practisch. Chem*, **90**, 323, 1863.

(2) Windaus, *Chem. Zeit.*, **30**, 1011, 1906.

Réaction de Salkowski (1) : Si on additionne une solution chloroformique de cholestérine d'acide sulfurique concentré, le chloroforme se colore en rouge, puis en bleu, vert et jaune.

L'acide sulfurique montre une fluorescence verte, et l'addition d'acide acétique donne une teinte rose puis pourpre.

Réaction de Liebermann-Bürchard (2) : A une solution chloroformique de cholestérine, on ajoute un peu d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. On obtient une coloration rose, bleue, puis verte. Pour de petites quantités de produit, c'est la teinte verte qui apparaît aussitôt.

Réaction de Tschugajew (3) : La cholestérine dissoute dans l'acide acétique est additionnée de chlorure d'acétyle et de chlorure de zinc. On chauffe cinq minutes et il se produit une coloration rouge ou rose avec une fluorescence jaune verte analogue à celle de l'éosine.

Mentionnons encore les réactions de Schiff (perchlorure de fer, acide chlorhydrique et chloroforme), de Denigès (4) (acide sulfurique, anhydrique acétique et chloroforme), de Neuberg (5) (rhanose et acide sulfurique), et d'Obermüller (6) (anhydride propionique et alcool).

Enfin Windaus (7) a proposé d'utiliser la formation d'un complexe de digitonine-cholestérine pour la re-

(1) Salkowski, *Pflüg. Arch.*, **6**, 207 (1872).

(2) Liebermann, *Berich. der deutsch. chem. Gesellsch.* Bürchard Diss. Rostock, 1889.

(3) Tschugajew, *Ref. Z. f. ang. Ch.*, 1900, p. 618.

(4) Denigès, *Soc. Pharm. Bordeaux*, 1903.

(5) Neuberg, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **47**, 335, 1906.

(6) Obermüller, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **15**, 39.

(7) Windaus, *Berich. d. deutsch. Chem. Gesellsch.*, XLII, 1909, p. 238.

cherche de la cholestérine et sa séparation des graisses, des lipoides phosphorés et même de ses propres éthers.

La cholestérine possède, en effet, la propriété de s'unir à des restes d'acides pour former des éthers. On a préparé des acétate, butyrate, stéarate, oléate, benzoate et chlorure de cholestérine. L'organisme animal et le sang en particulier, renferment de l'oléate et un peu de palmirate.

Ces éthers présentent à peu près les mêmes solubilités que la cholestérine, cependant leur solution dans l'alcool est plus difficile. Ils sont saponifiables, ne rancissent pas et possèdent des réactions colorées très voisines de celles de la cholestérine. La réaction de Liebermann, en particulier, leur est commune.

L'éther oléique cristallise en longues et fines aiguilles F : 41°-45°, et l'éther palmitique en plaquettes blanches F : 78°.

La digitonine est absolument sans action sur eux (1).

Pour séparer et doser la cholestérine totale, on utilise sa résistance à la saponification (2), ou bien la formation de produits d'addition avec le brome (3) et l'iode (4), ou enfin ses combinaisons avec l'acide benzoïque (5) et la digitonine (6).

Enfin, au point de vue biologique, la cholestérine pré-

(1) Windaus (*loc. cit.*, p. 21).

(2) Commaille, *J. P. C.* **22**, p. 442, 1875 ; E. Ritter, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **34**, p. 430 ; Kumagawa et Suto, *Bioch. Zeitsch.*, **8**, 1908, p. 212 ; Grigaut, *Soc. Biologie*, juin, juillet 1912.

(3) Obermüller, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **16**, 147 à 151.

(4) Lewkowitsch, *Bericht. d. deutsch. Chem. Gesellsch.*, **25**, 65, 1892.

(5) Gérard, *Contribution à l'étude des cholestérines végétale et animale*, Toulouse, 1895.

(6) Windaus (*loc. cit.*).

sente des propriétés anti-hémolytique (1) et antitoxique (2) très intéressantes. Par contre, ses éthers sont complètement inactifs.

(1) Ramson, Noguchi, Hansmann, Abderhalden, Landsteiner, Iscovesco.

(2) Physalix, Kyes et Sachs, Mintz, Wassermann et Takaki, Belonowski, Salkowski.

CHAPITRE III

MÉTHODES D'EXTRACTION

Les procédés qui ont servi jusqu'ici au dosage des matières grasses du sang ne paraissent pas avoir été soumis par leurs auteurs à un contrôle assez sévère. Il suffit pour s'en convaincre de jeter les yeux sur les analyses publiées ; pour une même substance : autant d'auteurs, autant de résultats différents.

L'extraction des lipoides et des graisses constitue la première opération dans tous les dosages. C'est la plus importante car ses résultats servent de base à la détermination particulière de chaque corps. Aussi, durant les dix dernières années, tous les auteurs se sont spécialement attachés à la perfectionner. Mais la plupart, ne pensant qu'à obtenir le rendement le plus élevé en extrait éthéré, ne remarquèrent pas qu'ils n'arrivaient à ce résultat qu'aux dépens de la pureté des produits.

Nous classerons les méthodes d'extraction en deux groupes :

I. Méthodes dans lesquelles un traitement approprié doit précéder l'extraction.

II. Méthodes dans lesquelles l'extraction a lieu directement.

1. — Description des méthodes.

I. Méthodes dans lesquelles un traitement approprié doit précéder l'extraction.

Si l'on veut extraire les matières grasses sans modifications, en employant leurs dissolvants habituels, éther, chloroforme, éther de pétrole, benzine, etc., comme ceux-ci ne sont pas miscibles avec les liquides de l'organisme ou les bouillies d'organes, il sera nécessaire de chasser d'abord toute trace d'humidité.

TRAITEMENTS PRÉALABLES

A. Déshydratation.

α) *Action de la chaleur.* — C'est le procédé le plus rapide et le plus fréquemment employé. On évapore au bain-marie et on termine la dessiccation à l'étuve à 100°.

Pour rendre l'épuisement plus efficace, on a conseillé le mélange de la substance avec du sable (1), du sulfate de soude (2), ou du plâtre (3); on évite ainsi la formation d'un coagulum trop compact; et la dessiccation est un peu hâtée.

β) *Action du vide et dessiccation à froid.* — Pour éviter l'action peut-être nuisible de la chaleur, on a proposé de lui substituer ou bien l'évaporation dans le vide au-dessus

(1) Gérard, J. P. C. (7) t. III, avril 1911.

(2) A. Lapworth, *Journ. de path. et bact.*, 1910, vol. 15, 254.

(3) Giovanni Garin, *Gazz. Osped.*, 32, et A. Lapworth.

d'acide sulfurique, ou encore l'absorption de l'humidité par des corps hygroscopiques, depuis le papier à filtrer (1) jusqu'à certains sels neutres desséchés : sulfate de soude, phosphate de soude (2) etc.,

Quel que soit le mode opératoire adopté, on obtient finalement un produit bien sec sur lequel on peut faire agir l'un des dissolvants énumérés plus haut.

Epuisement des produits deshydratés. — Le simple contact même avec des liquides bouillants est insuffisant et on doit le renouveler fréquemment. C'est pour rendre cette opération vraiment pratique que l'on a imaginé les appareils de lixiviation à chaud (Soxhlet, Zulkowski, Louïse) (3).

Malgré leur réelle commodité, aucun d'eux ne remplit exactement son but. En effet, l'extraction n'a plus lieu avec un liquide bouillant, car les vapeurs se condensent dans le réfrigérant en gouttelettes et celles-ci arrivent à peine tièdes sur la substance à épuiser.

Berntrop (4), Kumagawa et Suto (5), ont fait construire des appareils, dans lesquels la substance est placée dans une nacelle au sein de la vapeur du dissolvant ; dans ce cas, le liquide condensé reprend vite au contact du produit la température d'ébullition.

Nous donnons ici le modèle de l'appareil décrit dans

(1) Otto Voss, *Diss. Giesen*, 1909.

(2) Aladar Elfer, *Bioch. Zeitsch.*, **40**, p. 138 à 144, 1912 ; Lumière et Chevrotier, *Bulletin général de thérapeutique*, 168, **18**, 701, 1912.

(3) Zulkowski, *Dingler's polytech. journ.*, 1872, p. 298 ; Soxhlet, *Dingler's polytech. journ.*, 1879, p. 461.

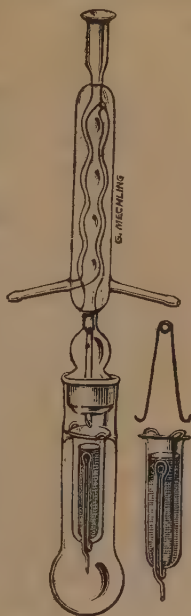
(4) J. C. Berntrop, *Zeitsch. f. angew. Chem.*, 1902, p. 122.

(5) Kumagawa et Suto, *Bioch. Zeitsch.*, **8**, 213 à 347, 1908.

le mémoire de Kumagawa et Suto. Il nous a servi pour toutes nos recherches définitives.

Il se compose d'un vase à distillation de capacité variable et d'un réfrigérant à reflux. Sur les parois du vase on a pratiqué trois petites pointes destinées à retenir un cylindre intérieur ; celui-ci est muni d'un siphon qui permet l'épuisement du produit. Deux petites oreilles latérales servent à retirer facilement le cylindre avec un crochet en fil de fer. Il est destiné à recevoir la douille de papier qui contient la substance à traiter.

La durée de l'extraction est très variable. Elle dépend de l'état et de la quantité de la substance à épuiser, puis de la nature du dissolvant. On s'arrête quand, par évaporation, le liquide d'extraction ne laisse plus de résidu appréciable.



B. Elimination et transformation des substances albuminoïdes.

Certains auteurs ont pensé que, malgré les nombreux perfectionnements apportés, la présence de l'albumine constituerait toujours un obstacle à l'extraction des graisses.

α) Digestion pepsique. — Pour l'éliminer, Pflüger (1) et ses élèves (2) ont utilisé la digestion pepsique, qui ne

(1) Pflüger, *Arch. f. d. gesamm. physiol.*, **51**, p. 277.

(2) Dormeyer, *Arch. f. d. gesamm. physiol.*, **61**, p. 341 et **65**, p. 90.

touche pas aux corps gras et transforme les matières protéiques.

(β) *Ebullition en milieu acide*. — La méthode précédente est un peu longue ; on a proposé de lui substituer une simple ébullition de la substance dans un acide dilué (1) : il se forme des acidalbumines solubles, et les graisses se rassemblent à la surface du liquide.

(γ) *Saponification directe par les alcalis*. — Enfin, Liebermann-Székely (2), puis Kumagawa et Suto (3) ont employé la saponification par les solutions alcalines concentrées.

Extraction des graisses libérées. — Dans ces méthodes l'extraction se fait soit par agitation, avec un dissolvant des graisses dans une ampoule à séparation, soit en utilisant un appareil construit pour « l'extraction des liquides » (Flussigkeitextractor).

II. Méthodes dans lesquelles l'extraction a lieu directement.

Elles sont basées sur l'emploi de dissolvants miscibles avec l'eau tels que l'alcool (4) ou l'acétone. Leur addition provoque dans le sérum la précipitation des albumines ; on isole le précipité par filtration et on

(1) E. Baur et Herm. Barschall, *Arch. kais. Gesundh. Amt.*, **30**, 54 à 62.

(2) Liebermann-Székely, *Arch. f. d. ges. physiol.*, **72**, p. 360.

(3) Kumagawa et Suto (*loc. cit.*, p. 26).

(4) Rosenfeld, *Centrabl. f. inn. Méd.*, 1900, **21**, n° 33, p. 833 ; Bogdanow, *Arch. f. d. ges. physiol.*, **68**, 431, 1897 ; Hoppe-Seyler, *Handbuch der physiologisch. chemisch. Analyse*, 7^e éd., p. 482.

l'épuise dans un appareil approprié avec une nouvelle quantité du même liquide ou avec un dissolvant différent, jusqu'à ce que, par évaporation, celui-ci ne laisse plus de résidu. On réunit les solutions qui doivent renfermer toutes les matières grasses.

Notons cependant que l'acétone seule ne peut être suffisante, car elle dissout mal la lécithine ; dans ce cas, on devra achever l'extraction par un traitement à l'éther.

Les méthodes diffèrent un peu dans l'application du principe général.

Dans les unes, les auteurs ont pensé que l'alcool ne pouvait, même à chaud, enlever toutes les graisses, et, pour eux, son rôle consisterait surtout à mettre immédiatement et sans modification la substance dans un état tel qu'elle puisse être traitée ensuite par un dissolvant plus énergique, l'éther par exemple. On pourrait donc presque aussi justement les ranger dans les méthodes de la première catégorie ; ici, en effet, le traitement préalable, au lieu de consister dans une dessiccation du sérum ou dans une transformation des protéines, est représenté par le contact avec l'alcool froid ou chaud.

Dans les autres ou mieux dans l'autre procédé, car nous n'en connaissons qu'un, les auteurs ont appliqué d'une façon plus exacte le principe de l'extraction directe. Pour eux, le contact dans l'alcool à froid constitue une extraction véritable, et, s'ils la complètent par un nouveau traitement à chaud, dans un appareil approprié, avec le même dissolvant, c'est parce que les substances à épuiser renferment des lipoides insolubles à froid et parce qu'une lixiviation prolongée est nécessaire pour enlever les dernières traces de substances grasses.

Cette méthode a été élaborée par Kumagawa et Suto (1). Y. Shimidzu (2) en a fait l'application au sang. Elle repose sur leurs nombreuses expériences comparatives sur le pouvoir des dissolvants vis-à-vis des graisses. Dans l'esprit des auteurs, elle ne constitue pas la forme originale de leur méthode d'évaluation des acides gras, qui est la saponification directe, mais elle représente une modification à employer dans certains cas où la saponification directe n'est pas satisfaisante.

A ce groupe se rattache la méthode d'Adam. Elle a été établie pour le dosage du beurre dans le lait ; cependant, modifiée ainsi que M. Grigaut (3) l'a indiqué, elle peut s'appliquer à l'extraction de la cholestérine du sang. La petite quantité d'alcali contenue dans la liqueur d'Adam suffit pour solubiliser les substances albuminoïdes, et la cholestérine peut dès lors passer facilement dans l'alcool-éther.

En principe, elle doit pouvoir également convenir pour l'extraction de la totalité des graisses et des lipoides.

2. — Discussion des méthodes.

Les procédés d'extraction, on le voit, sont nombreux et les principes qu'ils utilisent diffèrent notablement. Pour simplifier notre critique, au lieu d'exposer chronologique-

(1) Kumagawa et Suto, in *Handbuch d. biochemischen Arbeits methoden von Abderhalden*, vol. V, 1, p. 477.

(2) Y. Shimidzu, *Bioch. Zeitsch.*, Bd. 28, H. 3 et 4, p. 237, 1910.

(3) A. Grigaut, *Soc. Biologie*, 1912 et *Biologie médicale*, n° 3, mars 1913, p. 99.

ment les expériences de contrôle que nous avons fait porter sur les divers modes opératoires, nous allons nous demander à propos de chacun d'eux, s'il répond à ces trois critères :

1° L'extraction est-elle complète ?

2° Les matières grasses n'ont-elles pas subi au cours des traitements des modifications de nature à rendre impossibles les analyses qualitative et quantitative ultérieures ?

3° L'extrait éthéré obtenu est-il rigoureusement pur ?

Les recherches de nos devanciers et nos propres résultats vont nous donner les réponses.

1° L'extraction est-elle complète ?

I. Méthodes dans lesquelles un traitement approprié doit précéder l'extraction.

A. Déshydratation.

α) *Action de la chaleur.* — Gérard, puis Grigaut, en 1910, et différents auteurs, ont employé ce procédé pour l'extraction de la cholestérine. En opérant ainsi, ils obtenaient dans le sérum normal de 0 gr. 10 à 0 gr. 30 0/00 de cholestérine. Or, les chiffres donnés voici plus de vingt ans par Hoppe-Seyler, puis par Abderhalden, sont notablement plus élevés. Grigaut est vite revenu sur son erreur et la teneur actuellement admise oscille entre 1 gr. 50 et 1 gr. 80. On voit toute l'insuffisance de cette extraction.

Pour les graisses et les lipoïdes, on obtient en extrait éthéré 1 gr. 80 à 3 gr. 50 (Voss, Sauter, etc.) alors que des

procédés plus exacts donnent de 7 à 8 grammes par litre de sérum.

En desséchant au bain-marie du sérum mêlé à du sable, et, en procédant à l'extraction par l'éther dans l'appareil de Soxhlet (I), puis en traitant une seconde prise d'essai par notre méthode (II), nous avons obtenu les valeurs ci-dessous :

	I (Méthode Soxhlet)	II (Méthode employée)
Extraits étherés (repris à l'éther anhydre)	1 gr. 97	9 gr. 64 (brightique)

Le sulfate de soude et le plâtre, conseillés par Garin et Lapworth, ne donnent pas de meilleurs résultats.

β) *Action du vide et dessiccation à froid.* — Dès le début de nos recherches, nous avons voulu éviter l'action de la chaleur et nous avons desséché nos liquides à froid, en utilisant l'action du vide sulfurique. Nous avons obtenu ainsi un produit parfaitement sec, se détachant facilement en lamelles et transformable, par la pulvérisation, en une poudre très fine jaunâtre. Dans notre idée, nous ne déterminions pas ainsi des modifications importantes, puisque notre poudre pouvait se redissoudre dans l'eau. Nous citerons seulement une expérience pour montrer notre erreur :

	I	II
Extraits étherés (repris à l'éther anhydre)	1 gr. 68	9 gr. 27 (azotémique)

Nous avons songé ensuite à absorber l'humidité par le sulfate de soude desséché, procédé que Lecomte (1) avait

(1) Lecomte, J. P. C. 1901.

conseillé pour le dosage du beurre dans le lait, et, dont Chapus (1) s'est servi récemment pour l'extraction des graisses des matières fécales. Nos résultats ont encore été défectueux.

Nous n'avons pas essayé l'emploi du phosphate de soude indiqué par Aladar Elfer (2), puis par Lumière et Chevrotier (3).

Pour nos expériences précédemment citées, les extractions ont duré au moins six heures et elles ont été faites soit avec l'éther sulfurique à 65°, soit avec l'éther anhydre.

Nous nous sommes demandés comment pouvait s'expliquer cette résistance à l'action des dissolvants ? Dans l'emploi de la chaleur, il y a coagulation des substances albuminoïdes et la dessiccation à 100° peut emprisonner les graisses, de telle sorte, que la pulvérisation la plus minutieuse sera insuffisante pour les libérer complètement. Mais le même fait se reproduit en l'absence de coagulation, puisque, dans la dessiccation dans le vide ou dans la déshydratation par le sulfate de soude desséché, il n'y a pas de transformation du produit (solution de la poudre dans l'eau).

D'autre part, nous avons cherché à épuiser par différents dissolvants ces résidus. Nous avons remarqué d'abord, qu'après six heures d'extraction, un nouveau traitement à l'éther enlève encore des graisses. Il en est de même durant quatre jours ; l'extrait obtenu devient très faible mais il existe. — En second lieu, le produit

(1) A. Chapus, J. P. C. 1909 (6) t. XXX, p. 301.

(2) Aladar Elfer (*loc. cit.*, p. 26).

(3) Lumière et Chevrotier (*loc. cit.*, p. 26).

desséché à froid dans le vide et épuisé à l'éther, est ensuite traité par l'alcool à chaud. La solution alcoolique est distillée, l'extrait est séché puis repris par l'éther. On obtient ainsi une quantité de matières grasses bien plus considérable que dans la première extraction (0 gr. 85 au lieu de 0 gr. 19).

Si l'emprisonnement des graisses dans le coagulum albumineux était le véritable obstacle à l'extraction, l'alcool ne devrait pas mieux agir que l'éther.

On peut, semble-t-il, admettre plutôt, que les lipoides sont unis aux substances albuminoïdes, dans des combinaisons qu'il faut d'abord détruire, pour pouvoir les extraire en totalité ; l'alcool paraît à ce point de vue agir parfaitement. S'agit-il de lécithalbumines et de protéocholestérides (1), nous ne pouvons l'affirmer et nous enregistrons seulement ce que l'expérience nous fait constater.

Enfin, avant de quitter ce groupe de méthodes, rappelons que l'extraction dans l'appareil de Soxhlet est toujours insuffisante pour la raison indiquée plus haut (2). Nous avons procédé à deux opérations sur le même sérum, pour comparer l'extraction à l'alcool dans l'appareil de Soxhlet et dans celui de Kumagawa. Voici les résultats obtenus.

	Soxhlet	Kumagawa-Suto
Extraits étherés (repris à l'éther anydre).	8 gr. 05	9 gr. 18

B. Elimination ou transformation des substances albuminoïdes.

α) *Digestion pepsique.* — Pflüger (3) avait entrevu ce rôle nuisible des matières albuminoïdes ; il avait pensé,

(1) A. Grigaut, *Soc. Biologie*, 8 juin 1912.

(2) Voir p. 26.

(3) E. Pflüger (*loc. cit.*, p. 27).

lui aussi, qu'il était nécessaire de détruire la combinaison de graisses et de protéines et c'est pourquoi il avait proposé la méthode à la digestion pepsique ; Kumagawa et Suto en ont étudié la valeur dans leur mémoire. D'après leurs expériences comparatives, il ressort que l'extraction est très supérieure à celle des méthodes précédentes. Cependant, ils ont pu déceler une quantité de 15 0/0 environ d'acides gras qui échappent au dosage dans la méthode par digestion.

β) *Ebullition en matière acide.* — Baur et Barschall (1) ont substitué à la digestion pepsique, la transformation des protéines par les acides. Nous n'avons eu connaissance de cette méthode que depuis très peu de temps ; nos premiers essais de contrôle paraissent fournir des résultats voisins de ceux de la méthode précédente.

γ) *Saponification directe par les alcalis.* — Enfin, Liebermann-Székely (2), puis Kumagawa et Suto (3) ont pensé à traiter directement la substance par une solution alcaline concentrée. Les derniers auteurs en comparant la méthode de Liebermann et la leur, ont retrouvé dans la première des pertes de 9 à 10 0/0. Ils ont fait eux-mêmes la critique de leurs résultats personnels et ils paraissent véritablement avoir obtenu l'intégralité des acides gras supérieurs existant dans le produit à traiter.

II. Méthodes dans lesquelles l'extraction a lieu directement.

Nous avons fait des recherches comparées :

(1) Baur et Herm. Barschall (*loc. cit.*, p. 28).

(2) Liebermann-Szekely (*loc. cit.*, p. 28).

(3) Kumagawa et Suto (*loc. cit.*, p. 28).

1° Sur l'extraction à l'alcool froid, suivie d'un épuisement à l'éther au soxhlet.

2° Sur l'extraction à l'alcool froid et chaud avec ou sans soxhlet, puis avec l'appareil de Kumagawa.

3° Sur l'emploi de l'acétone combiné à un traitement à l'éther. Kumagawa et Suto ont fait eux-mêmes la critique de la méthode à l'alcool-chloroforme.

Ils ont montré, d'autre part, qu'une poudre de viande traitée par l'alcool à froid, puis à chaud dans leur extracteur, ne donnait plus rien ensuite à la saponification directe. Nous avons repris leurs expériences pour le sérum. Une prise d'essai, épuisée comme précédemment à l'alcool, a d'abord été traitée par l'éther anhydre. On obtient ainsi un résidu très peu important, qui donne une réaction de Liebermann négative ; un essai de caractérisation des acides gras n'a pas été plus heureux. Nous avons alors saponifié le contenu de notre douille à extraction par la soude concentrée : nous n'avons pas obtenu trace d'acides gras.

Enfin, nous avons fait comparativement, sur un mélange de sérums, des dosages par saponification directe ou par saponification consécutive à l'extraction alcoolique. Les résultats correspondent au total des acides gras libérés et de la cholestérine.

	Kumagawa-Suto (direct)	Kumagawa-Suto (Alcool)
I	5,47	5,32
II	5,43	5,42
III	5,37	5,37

On voit que les résultats sont tout à fait concordants.

Si nous regardons la méthode originale de Kumagawa et Suto comme la seule méthode exacte de contrôle que

nous possédions pour l'extraction des graisses, nous pouvons conclure, que le traitement à l'alcool dans l'extracteur assure l'épuisement complet du sérum.

Nous avons encore rapproché les résultats de la méthode de Kumagawa des résultats fournis par les méthodes utilisant deux dissolvants. Les extraits étherés n'ont pas été appréciés directement, mais après saponification, d'après leur teneur en acides gras et cholestérine. (Le chiffre variable des impuretés des extraits étherés rend toute comparaison rigoureuse impossible). Nous avons toujours trouvé ainsi des pertes allant de 8 à 18 0/0.

	Kumagawa-Suto (direct)	Alcool-éther	Acétone-éther
1 ^{er} Sérum	8,50	7,76	7,68
2 ^e Sérum	7,62	7,04	»

Nous avons vu précédemment que l'extraction à l'alcool chaud dans le soxhlet causait également des pertes.

Nous avons fait, en dernier lieu, quelques essais seulement sur l'application de la méthode d'Adam au dosage des graisses du sérum. Le traitement a été répété deux fois. Trois expériences sur le même sérum nous ont donné des résultats concordants entre eux, mais notablement inférieurs aux chiffres obtenus par extraction alcoolique complète.

Extraits étherés (repris par l'éther anhydre)	I	4,61
	II	4,66
	III	4,64

Il pourrait être intéressant de revenir sur cette question, et de voir si, à la suite de modifications, on ne pourrait arriver à une extraction complète et rapide des graisses, comme Grigaut l'a réalisée pour la cholestérine.

Avant de quitter l'étude de l'extraction, nous rappelle-

rons encore quelques recherches, faites en vue de déterminer le rôle respectif de l'extraction par l'alcool à froid et à chaud dans la même expérience. Voici les résultats obtenus sur le sérum de trois malades.

		à froid	à chaud	total
Extraits étherés (repris par l'éther anhydre)	I	3,94	3,18	7,12
	II	11,62	5,69	17,31
	III	25,73	19,13	44,86

Concluons enfin cette étude, en reconnaissant, que seules les deux méthodes proposées par Kumagawa et Suto : saponification directe, ou extraction alcoolique à l'aide de l'extracteur à chaud, peuvent donner la totalité des graisses et des lipoides existant dans le sérum à examiner.

2° Les matières grasses n'ont-elles pas subi au cours des traitements des modifications de nature à rendre impossibles les analyses qualitative et quantitative ultérieures ?

Nous pensons que la dessiccation préalable ne doit pas influencer sur les graisses ; nous faisons toutefois des restrictions, dans le cas de l'emploi de la chaleur, et d'un séjour un peu prolongé dans l'étuve à 100°.

En principe, la méthode à la digestion pepsique ne doit pas apporter de modifications ; la petite quantité d'acide chlorhydrique introduite peut tout au plus décomposer les savons. Nous n'avons pas fait de recherches sur ce sujet, car nous ne pouvions pas utiliser plus tard cette méthode.

Dans les procédés de Baur et Barschall, de Lieberman-Székelly, de Kumagawa et Suto (direct), l'altération est évidente. Dans le premier cas, les lécithines sont hydrolysées en acides gras et acide glycérophosphorique ; dans le

deuxième cas, les graisses, les éthers de la cholestérine, les lécithines seront transformées.

Enfin, la méthode à l'alcool ne paraît pas modifier l'état chimique des graisses et des lipoïdes, du moins, dans la mesure dans laquelle nos connaissances nous permettent de l'apprécier.

3° L'extrait éthéré obtenu est-il rigoureusement pur ?

Nous distinguerons ici : les méthodes qui nous donnent les graisses et les lipoïdes modifiés, et les méthodes qui les enlèvent au sérum sans altérations.

Quels procédés pouvons-nous employer pour répondre à cette question ? Si nous étions en présence d'un seul élément, nous pourrions appliquer les vérifications habituelles : point de fusion, pouvoir rotatoire, etc. ; mais nous sommes ici en présence d'un mélange extrêmement variable et nous n'avons que des moyens détournés pour procéder à cette vérification.

Les impuretés qui peuvent souiller notre extrait sont des produits solubles dans l'alcool et dans l'éther. Ce sont aussi, nous allons le voir, des produits à peu près insolubles dans ces dissolvants, qui passent cependant à la faveur des autres corps en présence. Tels sont les substances azotées, les sels minéraux, les pigments, etc. Chez les malades, chez certains malades plutôt, ces impuretés sont très abondantes et très variées (ictères).

D'après l'examen de la composition de l'extrait éthéré théoriquement pur, on voit que le soufre n'y existe point et que le phosphore et l'azote y sont en quantité proportionnelle à la lécithine. Ce sont les éléments les plus faciles à doser.

Kumagawa et Suto ont fait des recherches sur l'extrait éthéré de poudre de viande : ils y ont trouvé de petites quantités de soufre, de l'acide lactique, et des substances azotées en forte proportion, notamment de la créatine qu'ils ont pu identifier.

Pour le sérum, nous avons pensé que, le plus simple était d'admettre que le phosphore de l'extrait éthéré appartenait tout entier à la lécithine. Ce point admis, on calcule l'azote fourni par le poids de lécithine obtenu, on dose l'azote total de l'extrait éthéré et on compare les résultats.

Nous donnons à titre d'exemple une de ces déterminations.

Poids de phosphomolybdate	lécithine	azote calculé	azote trouvé
0,32	0,14	0,0024	0,018

Ce résultat obtenu pour l'azote donnerait 1 gr. 02 de lécithine. Kumagawa et Suto ont trouvé pour la poudre de viande une erreur encore plus forte.

Il passe donc dans l'extrait éthéré des sujets normaux ou admis comme tels des substances azotées ; chez les ic-
tériques, la proportion en est bien plus considérable. Dans l'extraction au soxhlet, par l'éther anhydre, du sérum desséché et pulvérisé d'un azotémique (3 gr. 50 d'urée par litre), nous avons pu, après quatre jours d'extraction, recueillir dans les solutions éthérées, des cristaux nombreux que nous avons identifiés avec l'urée ; leur poids, rapporté au litre, représentait 1 gr. 98 d'urée par litre de sérum. Cette forte quantité n'avait pu rester en solution dans les petites quantités d'éther employées pour l'extraction, et elle avait cristallisé.

Nous avons enfin un autre moyen de vérifier la pureté

de notre extrait éthéré. Celui-ci est saponifié ; on obtient les acides gras totaux et la cholestérine ; puis, le phosphore est dosé dans la solution aqueuse et on établit le poids de lécithine. Si on ajoute aux acides gras totaux, diminués des acides gras de la lécithine, la cholestérine et la lécithine, on doit avoir sensiblement l'extrait éthéré pur. Les pertes possibles correspondent au départ de la glycérine, et à la différence causée par la présence de lipoides phosphorés autres que la lécithine. Elles sont en fait insignifiantes, et d'un ordre tout à fait différent de celles que nous avons observées. Voici quelques exemples :

	Extrait éthéré (repris par éther anhydre)	Acides gras totaux, cholestérine et lécithine	sujet examiné
I	8,10	6,68	normal
II	6,87	5,97	—
III	13,42	11,02	normal (après absorption de beurre)
IV	21,20	18,40	néphrite syphilitique
V	17,31	14,60	—
VI	55,43	47,14	Xanthôme
VII	33,20	24,57	Ictère
VII	9,58	8,23	Azotémique

Dans l'extraction éthérée au soxhlet des sérums deséchés et pulvérisés, l'extrait est plus pur que dans les cas précédents : nous avons vu, par contre, son insuffisance.

En ce qui concerne les méthodes, dans lesquelles on obtient par saponification les acides gras et la cholestérine, si on purifie avec soin l'extrait éthéré par l'éther anhydre, puis par l'éther de pétrole, on obtient des produits très satisfaisants ; malheureusement, elles interdisent la répartition des éléments de la matière grasse.

Nous avons vu que les deux méthodes proposées par Kumagawa et Suto assurent l'extraction complète des graisses : l'une permet d'obtenir l'extrait éthéré non trans-

formé, mais impur, l'autre nous donne un extrait bien pur, mais complètement modifié.

Il est donc nécessaire, pour analyser complètement les graisses des sérums, de combiner ces deux méthodes, comme l'ont proposé Kumagawa et Suto et comme Shimidzu l'a appliqué dans la suite. On n'obtient pas encore ainsi, d'ailleurs, le but désiré.

En effet, si on saponifie directement l'extrait alcoôlique comme les auteurs précédents l'ont proposé, celui-ci peut amener des impuretés, qu'il est nécessaire d'éliminer pour un dosage complet. Il s'agit surtout des phosphates minéraux, qui sont passés en partie dans la solution hydro-alcoolique, et qui, dans la saponification, se mêleraient aux phosphates formés dans l'hydrolyse de la lécithine, et causeraient ainsi de fortes erreurs. Shimidzu, ne dosant pas les lipoides phosphorés, n'a pas eu à envisager cette précaution.

On remédie facilement à cet inconvénient, en reprenant l'extrait alcoôlique bien séché à 50°, par l'éther anhydre, qui dissout complètement les graisses et les lipoides, et qui élimine beaucoup d'impuretés, les phosphates en particulier. Cette opération introduit toutefois dans les résultats, une légère erreur : les savons, n'étant pas solubles dans l'éther anhydre, il y a ainsi une petite perte d'acides gras. Quelques expériences nous ont montré, que cette perte n'était pas considérable, et que leur détermination n'était pas indispensable pour le moment. Il est, d'ailleurs, possible de les évaluer, en traitant le résidu insoluble dans l'éther (1).

C'est pour cette raison, que des dosages comparatifs

(1) Voir p. 74.

nous ont donné des chiffres d'acides gras un peu plus faibles, dans le cas de reprise de l'extrait par l'éther anhydre. La cholestérine n'est naturellement pas modifiée :

		Künagawa (direct)	Künagawa (alcool)	Künagawa (alcool et reprise à l'éther anhydre)
Acides gras	I	5,47	5,32	5,17
Cholestérine	II	5,43	5,42	5,23
»	III	5,37	5,37	5,12
Cholestérine	I	2,02	1,94	1,91
»	II	1,92	2,11	1,96
»	III	1,86	2,07	»

CHAPITRE IV

MÉTHODES DE DOSAGE DES GRAISSES NEUTRES ET DES ACIDES GRAS

La méthode générale de dosage, commune aux graisses neutres et aux acides gras, consiste à traiter à chaud le produit à analyser par un alcali, puis à décomposer les savons formés par addition d'un acide, enfin à enlever les acides gras libérés par un de leurs solvants, l'éther en particulier.

Mais nous venons de voir, que l'extrait éthéré des liquides organiques ou des bouillies d'organes, renferme, à côté des graisses proprement dites, des lipoides capables de fournir par hydrolyse des acides gras qui, en s'ajoutant à ceux des graisses, viennent fausser les résultats.

Nous avons donc à étudier ici, comment dans les méthodes précédemment décrites, on a cherché à éviter cette cause d'erreur ; puis, comme les procédés employés ne nous ont pas donné satisfaction, nous exposons brièvement, quelles modifications nous avons apportées dans nos recherches, qui nous permettent de doser, d'une façon à peu près rigoureuse, les graisses neutres et les acides gras.

Remarquons, d'abord, que ce dosage n'est réellement exécuté que dans un très petit nombre de méthodes. Kumagawa et Suto s'expriment ainsi à ce sujet : « Notre méthode n'est pas un procédé de dosage des graisses, mais une détermination quantitative des acides gras totaux à poids moléculaire élevé, contenus dans la substance animale à étudier. Aucune des méthodes connues jusqu'ici, ne permet d'isoler de la substance animale les graisses neutres seules et quantitativement. Nous ne pouvons donc pas déterminer séparément les combinaisons à radicaux d'acides gras. Provisoirement, on doit se contenter d'extraire la totalité des substances lipoides, à l'état aussi pur que possible ; mais l'extrait obtenu est un mélange, qui ne donne pas d'unité comparable, et on doit choisir plutôt les acides gras à poids moléculaire élevé, qui sont communs à toutes les combinaisons connues. »

La plupart des méthodes générales de dosage des graisses les déterminent en bloc ou par différence. Quelques auteurs, seulement, ont cherché à séparer les lipoides soit pour les doser, soit pour permettre d'obtenir les graisses neutres et les acides gras libres.

On pouvait penser :

1° A éliminer tous les lipoides susceptibles de fournir des acides gras ;

2° A décomposer, par une saponification ménagée, seulement les lipoides, dont le dosage ultérieur permettrait de calculer les acides gras libérés ;

3° A combiner enfin les deux méthodes, c'est-à-dire, à éliminer les lipoides dont on ne pouvait par la suite évaluer l'apport en acides gras ; puis, à saponifier le reste, y

compris les lipoides dont on pouvait connaître la teneur en acides gras.

1° *Elimination des lipoides susceptibles de fournir des acides gras.*

A) *Elimination de la lécithine (lipoides phosphorés).*

Elle peut se faire de deux façons :

a) *En nature.* — Elle est basée sur l'emploi d'un corps, dans lequel la lécithine seule est insoluble ; c'est l'acétone du commerce, ou mieux encore, l'acétone pure du bisulfite.

L'extrait éthéré est dissous dans une petite quantité d'éther anhydre ; on verse la solution dans un grand excès d'acétone. Il se fait un précipité, qu'on sépare par filtration ou mieux par centrifugation ; on le lave, on le sèche et on le pèse.

Comme contrôle, on dose le phosphore à l'état de phosphomolybdate, sur la moitié de l'extrait éthéré mise en réserve.

1° *Précipitation par l'acétone purifiée (56°-58°).*

Extrait éthéré total : 1 gr. 10, soit 0 gr. 55 pour chaque opération :

Phosphomolybdate (sur l'extrait)	Lécithine	Précipité acétonique	Phosphomolybdate	Lécithine
0,165	0,072	0,084	0,119	0,052

Le précipité déterminé par l'acétone renferme, à côté de substances étrangères, une partie seulement de la lécithine contenue dans l'extrait éthéré.

2° *Précipitation par l'acétone pure (du bisulfite).*

Nous n'avons fait ici que rechercher le phosphore dans le filtrat acétonique ; nous avons nettement caractérisé sa présence.

3° *Modification de Nerking (1).*

J. Nerking a proposé, pour rendre la précipitation plus complète, d'ajouter au mélange de solution éthérée de lécithine et d'acétone, une petite quantité de solution alcoolique saturée de chlorure de magnésium. Cette modification améliore la précipitation de la lécithine, mais elle n'empêche pas l'entraînement de substances étrangères dans le précipité.

L'élimination rigoureuse de la lécithine ne peut donc être obtenue, ni par l'acétone purifiée, ni par l'acétone pure, ni par l'acétone et le chlorure de magnésium en solution alcoolique saturée.

b) *En combinaisons.* — On a pensé, à utiliser la propriété de la lécithine, de se combiner avec le chlorure de platine ou le chlorure de cadmium.

Ces méthodes, recommandables pour une extraction qualitative, n'offrent pas d'intérêt pour un dosage rigoureux.

Nous ne possédons donc pas, actuellement, de technique exacte pour isoler la lécithine.

B) Élimination de la cholestérine.

a) *En nature.* — Ce procédé, décrit par Hepner (2), employé par Woldridge (3), consiste à traiter l'extrait éthéré

(1) J. Nerking, *Bioch. Zeitsch.*, **10**, 193, 1909.

(2) Hepner, *Arch. f. d. ges. physiol.*, **73**, 602, 1898.

(3) Woldridge, *Arch. f. d. ges. physiol.*, 381, 1881.

par l'éther acétique pur, à la température d'ébullition, puis à laisser refroidir lentement. Tous les corps gras, autres que la cholestérine et ses éthers, sont intégralement précipités.

Cette méthode séduisante a été plusieurs fois essayée au cours de nos recherches. La cholestérine n'est pas précipitée, mais, par contre, il reste des graisses en solution d'une façon notable, ce qui enlève toute valeur quantitative.

Un extrait étheré du poids de 0 gr. 672 est divisé en deux parties.

1° 0 gr. 336 sont saponifiés : on obtient 0 gr. 081 de cholestérine totale ;

2° 0 gr. 336 sont traités par 30 centimètres cubes d'éther acétique au bain-marie bouillant ; tout se dissout et on laisse refroidir lentement. Au bout de vingt-quatre heures, on décante la solution et le précipité reste adhérent au fond du vase. La solution évaporée laisse un résidu de 0 gr. 214. En admettant que toute la cholestérine soit à l'état d'éther ($0,081 \times 1,73 = 0,14$), cela n'expliquerait pas la quantité restée en solution. Le résidu est séché pour bien chasser toute trace d'éther acétique ; on le dissout dans le chloroforme et on fait la réaction de Liebermann sur la solution obtenue : la réaction est sensiblement négative.

b) *En combinaison.* — Windaus (1) a signalé la propriété de la cholestérine, de former avec la digitonine un complexe insoluble dans l'alcool froid et dans l'éther. Il s'en est servi, pour l'étude de cette substance dans les reins nor-

(1) Windaus, *Bericht. d. deut. chem. Gesellsch.*, **42** (1), 1009, p. 238.

maux et pathologiques (1), et Fraser et Gardner (2), puis Mayer et Schaeffer (3) ont confirmé ses résultats.

Nous verrons des applications de cette méthode à propos du dosage de la cholestérine.

2° Saponification ménagée de l'extrait éthéré.

Salkowski (4), puis Pribram (5), ont donné des techniques pour séparer les éthers de la cholestérine des graisses. Elles reposent sur la rapidité de la saponification, ou l'emploi de la lipase comme agent de dédoublement.

Nous avons nous-mêmes essayé le faible pouvoir de saponification de l'eau de baryte. Nous espérions ainsi dédoubler les graisses neutres, et peut-être, une petite quantité de lécithine sans toucher aux éthers de la cholestérine.

L'expérience nous a montré dans notre cas, comme dans ceux de Salkowski et de Pribram, que les éthers de la cholestérine étaient assez facilement saponifiables, pour ne pas permettre aux graisses d'être décomposées totalement, avant qu'eux-mêmes ne fussent touchés.

Nous pouvons probablement placer ici la méthode par alcoolyse de Fourneau et Piettre (6).

Dans leur communication, ces auteurs mentionnent qu'ils obtiennent un dépôt de cholestérine bien cristallisée,

(1) Windaus. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **65**, 110, 1910.

(2) M. Fraser et Gardner, *Proceedings Royal Society London*, **81**, **82**, etc.

(3) A. Mayer et G. Schaeffer, *Soc. Biologie*, 2 mars 1912.

(4) Salkowski, *Berichte Zeitung*, I, 413, 1906.

(5) H. Pribram, *Bioch. Zeitsch.*, **1**, 1906.

(6) Fourneau et Piettre, *Bull. soc. Chim.*, 1912.

et très pure. Ils indiquent même ce procédé, comme une excellente méthode de dosage de la cholestérine. Il est fort probable, que là encore, les éthers de la cholestérine sont dédoublés comme les graisses et les lipoides phosphorés.

Ce détail n'est pas précisé et nous n'avons pu le vérifier jusqu'ici.

3° Combinaison des deux méthodes.

Windaus (1), ayant remarqué que les éthers de la cholestérine sont sans action sur la digitonine, proposa de séparer ainsi la cholestérine de ses éthers. Il analysa par cette méthode les extraits étherés de reins humains et obtint de bons résultats. Fraser et Gardner (2) firent, d'après le même principe, des dosages sur le sang des lapins.

Ces recherches de Windaus, dont nous donnons plus loin des expériences de contrôle, nous permettent désormais, d'envisager la possibilité d'une détermination proprement dite des graisses neutres et des acides gras. En effet, si l'on sépare d'abord la cholestérine libre par la digitonine, on peut saponifier ensuite le reste de l'extrait étheré sans précautions particulières. Les dosages du phosphore et de la cholestérine libérée nous font connaître l'apport en acides gras, et nous pouvons alors évaluer, d'une façon sensiblement (3) exacte, la quantité d'acides

(1) Windaus (*loc. cit.*, p. 48.)

(2) M. Fraser et Gardner (*loc. cit.*, p. 48).

(3) Nous disons « sensiblement », car nous sommes obligés d'admettre pour les calculs, que tout le phosphore est représenté par de la lécithine distéarique, et que la cholestérine combinée, l'est uniquement à l'acide oléique.

gras venant des graisses neutres et des acides gras libres.

Windaus, Fraser et Gardner, n'ont eu comme but que la détermination des rapports entre les cholestérines libre et éthérifiée. Nous avons profité de leurs travaux, et nous avons pu, en apportant quelques modifications à leur technique, appliquer ce procédé à l'analyse complète de l'extrait éthéré. C'est ainsi, que nous avons pu doser séparément, les graisses neutres, les cholestérines libre et éthérifiée et les lipoides phosphorés.

CHAPITRE V

MÉTHODES DE DOSAGE DE LA CHOLESTÉRINE

Nous devrions étudier seulement, les méthodes susceptibles d'être employées dans notre analyse générale. Nous donnerons cependant plus de développement à cette question. On a beaucoup étudié depuis quelque temps les variations de la cholestérinémie ; comme presque tous les dosages ont été faits par des méthodes colorimétriques, nous ne pouvons les passer sous silence.

Les découvertes de Hürtle (1) et de Letsche (2), ont obligé à distinguer deux séries de méthodes : les unes déterminent la cholestérine totale, les autres les cholestérines libre et éthérifiée.

1° Méthodes de dosage de la cholestérine totale.

Les méthodes colorimétriques sont les plus simples. Dès 1889, Burchard (3) proposa l'emploi de la réaction de Liebermann pour doser la cholestérine. L'année suivante

(1) Hürtle, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **21**, 331, 1896.

(2) Letsche, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **53**, 31 à 112, 1907.

(3) Burchard, *Inaug. Dissertation Rostock*, 1889.

Schulze (1) en critiqua la valeur. En 1910, Grigaut (2) reprit le principe de Burchard, et eut le mérite de déterminer les conditions dans lesquelles on peut faire un dosage suffisamment précis pour les besoins de la clinique. L'année suivante, en collaboration avec Chauffard et Laroche (3), il fit de nombreuses applications, de sa méthode à la pathologie. Il fut vivement pris à partie, peu après, par Gérard (4) et Iscovesco (5). Ce dernier proposa de substituer à la réaction du cholestol celle de Tschugaieff (6) qui, d'après lui, présentait plus de stabilité et de sensibilité. Des expériences de Mauriac et Defaye (7) montrèrent un peu plus tard, que cette réaction ne présentait aucun avantage sur celle de Liebermann, et que les résultats donnés par ces deux méthodes étaient entièrement différents.

Neumann et Hermann (8), puis Weston et Kent (9), firent aussi des dosages colorimétriques, mais par des procédés moins précis que celui de Grigaut.

A la suite des différentes critiques, qui lui ont été adressées, que peut-on penser du dosage colorimétrique de la cholestérine ? Il est rapide et essentiellement pratique. Comme tous les procédés colorimétriques, il peut donner

(1) Schulze, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **14**, 491 à 503, 1890.

(2) A. Grigaut, *Soc. Biologie*, 7 et 14 mai 1910, 25 nov. 1911.

(3) Chauffard, Laroche et Grigaut, *Soc. Biologie*, janvier à juillet 1911.

(4) Ern. Gérard, *Soc. Biologie*, 3 février 1912.

(5) H. Iscovesco, *Soc. Biologie*, 17 février 1912 et 22 juin 1912.

(6) H. Iscovesco, *Soc. Biologie*, 24 février 1912.

(7) Mauriac et Defaye, *Soc. Biologie*, 13 juillet 1912.

(8) Neumann et Hermann, *Wien. klin. Wochenschr.*, **12**, 411-417, 23 mars 1911.

(9) Weston, P. G. et Kent, G. Helen, *Journ. med. Research.*, **26**, 3, p. 523; Weston, P. G. *Journ. med. Research.*, **26**, 1, p. 47, 1912.

lieu à de légers écarts dans les appréciations. En tout cas, la technique de Grigaut est certainement de toutes la plus recommandable.

Nous reconnaissons que pour une analyse exacte, les méthodes pondérales doivent être préférées ; si le dosage demande ainsi plus de temps, il offre par contre une plus grande certitude.

Boidin et Flandin (1) ont proposé une méthode très curieuse, basée sur les propriétés hémolytiques de la saponine et leur fixation par la cholestérine. Disons de suite avec ces auteurs, qu'elle ne peut fournir que des renseignements cliniques. Cependant, nous nous proposons d'en continuer l'étude comparative, en rapprochant ses résultats de ceux que fournit la pesée. Nos premières recherches (2) ont porté, en effet, sur le sérum des ictériques, chez lesquels la cholestérine libre domine, et nous ne déterminions dans nos dosages que la cholestérine totale. Nous allons reprendre cette comparaison avec des sujets normaux et avec des brightiques ; chez eux, en effet, nous avons mis en évidence par notre méthode générale, l'existence de grandes quantités d'éthers de la cholestérine. Nous pourrions donc vérifier si, comme nous le prévoyons, le procédé de Boidin et Flandin s'applique seulement à la cholestérine libre.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus au cours de nos premières expériences. Il met en parallèle les chiffres obtenus dans la détermination de la résistance globulaire, dans le dosage de la cholestérine totale, et

(1) Boidin et Flandin, *Soc. Biologie*, 11 nov., 1911.

(2) Oulmont et Boidin, *Presse Médicale*, n° 50, 19 juin 1912, p. 525.

dans la mesure de l'action empêchante des sérums vis-à-vis de la digitonine (1) :

	Résistance globulaire	Cholestérine totale.	Action empêchante
I Sérum normal	44	1,80	3
II)	57	0,90	2
III)	45	1,50	3
IV } Ictère hémolytique . . .	52	0,95	2
V }	50	0,90	2
VI }	52	1,15	2
VII Cirrhose de Hanot	35	»	8
VIII Ictère lithiasique	36	8,16	12
IX Ictère néoplasique	34	5,34	14
X Ictère par rétention. (?) . .	30	5,14	18

On a aussi proposé d'appliquer, au dosage de la cholestérine, la propriété qu'elle possède de fixer le brome et l'iode. Ce sont les méthodes d'Obermüller (2) et de Lewkowitsch (3). Leur intérêt général ne se retrouve pas dans la pratique, surtout lorsqu'il s'agit de doser de très petites quantités de produit. En outre, elles ne conviendraient pas à notre analyse générale.

Les méthodes pondérales sont toutes basées sur la saponification, et la séparation des substances insaponifiables par un dissolvant approprié. Elles ne diffèrent entre elles que par la proportion ou la nature de l'agent saponifiant, par la température à laquelle cette opération se produit, enfin par la réaction alcaline ou acide du mélange au moment de l'extraction. Les méthodes principales sont

(1) Boidin et Flandin, *Soc. Biologie*, 1911, p. 402 ; 1912, p. 28, 6 janvier.

(2) Obermüller, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **16**, 143.

(3) Lewkowitsch, *Bericht. d. deutsch. Chem. Gesellsch.*, **25**, 65, 1892.

dues à Ritter (1), Kumagawa et Suto (2), Grigaut (3), etc.

Nous avons cherché à plusieurs reprises, à établir une comparaison entre les résultats fournis par les différentes méthodes. Nous n'avons pas employé la méthode de Ritter, car elle convient plutôt pour saponifier des quantités assez notables de matière grasse.

	Kumagawa (direct)	Grigaut
I	2,02	1,95
II	1,92	2,00
III	1,06	1,88
I	2,01	1,90
II	1,97	1,96
III	»	2,02

Nous avons ensuite combiné les méthodes précédemment décrites, en épuisant le sérum par l'alcool selon Kumagawa et Suto, puis en saponifiant l'extrait alcoolique à l'autoclave, et en séparant la cholestérine d'après les indications de Grigaut.

Nous avons eu ainsi de bons résultats. Ceux que nous rapportons ci-dessous, ont été obtenus sur le même mélange de sérums, qui a permis de réaliser les premières expériences du précédent tableau.

	Méthodes combinées
I	2,08
II	2,01
III	1,99

Nous devons noter cependant, que parfois, l'accord entre les méthodes a été moins rigoureux : ces différences ont été causées sans doute par des négligences opératoires.

(1) Ern. Ritter, *Zeitsch. f. physio. Chem.*, **34**, 430.

(2) M. Kumagawa et K. Suto, *Bioch. Zeitsch.*, **8**, 212, 1908.

(3) A. Grigaut, *Soc. Biologie*, 18 nov. 1911, 25 juin et 20 juillet 1912.

D'après Kumagawa, dans la saponification des organes, on n'obtiendrait pas de la cholestérine pure, mais un mélange qu'il appelle « l'insaponifiable ».

Nous avons pu souvent constater, que la cholestérine obtenue d'après la technique de Grigaut, cristallise plus facilement et plus complètement que dans le procédé de Kumagawa et Suto. Au point de vue pondéral, les différences sont insignifiantes. Nous n'avons pas déterminé, d'ailleurs, le facteur qui intervenait dans cette dernière méthode, pour donner des produits de forme peu constante.

Contrairement à l'opinion de Shimidzu (1), nous avons souvent employé la méthode directe de Kumagawa et Suto pour l'analyse des sérums, et les résultats ont toujours été très concordants.

Dans le but d'isoler la cholestérine intégralement et rapidement, Gérard (2), puis Gardner (3), ont proposé de la séparer à l'état de benzoate. Mayer et Schaeffer (4) ont préféré former un complexe avec la digitonine. Ces procédés sont également intéressants : nous donnerons cependant la préférence au second à cause de sa rapidité.

Nous en avons déjà fait mention dans le chapitre précédent : nous allons ici en exposer brièvement le principe.

La digitonine, en solution alcoolique, mélangée avec une solution alcoolique de cholestérine, à la température d'ébullition, possède la propriété de former avec celle-ci un complexe, qui se précipite et que l'on peut recueillir,

(1) Y. Shimidzu, *Bioch. Zeitsch.*, **28**, H. 3, p. 237, oct. 1910.

(2) Ern. Gérard, *Contribution à l'étude des cholestérines végétale et animale*. Toulouse, 1895.

(3) E. Gardner, *Proceedings Royal Society London*, **80**, (1908).

(4) A. Mayer et G. Schaeffer, *Soc. Biologie*, 2 mars 1912.

purifier et peser après dessiccation. Windaus (1) en a fait l'étude, et a montré que la réaction devait se passer selon l'équation :



La combinaison est suffisamment stable pour servir à un dosage ; elle offre, d'autre part, l'avantage d'être décomposable par une extraction prolongée au xylol, ce qui permet d'isoler la cholestérine et de vérifier l'opération. Nous donnons un peu plus loin les résultats des expériences de contrôle, que nous avons cru devoir faire, avant d'adopter cette méthode.

Nous avons vu enfin, à propos du dosage des graisses, que Fourneau et Piettre (2) obtenaient par alcoolysé, la cholestérine bien cristallisée et pure. Comme dans leur note ces auteurs n'apportent pas d'expériences de contrôle, nous attendrons l'apparition d'un mémoire plus détaillé pour porter un jugement.

En résumé, nous ne pouvons appliquer directement aucune de ces méthodes, puisqu'elles sont toutes destinées au dosage de la cholestérine totale.

Nous verrons cependant, que quelques-unes peuvent être utilisées, à un certain moment, dans la méthode d'analyse complète des graisses et des lipoïdes.

2° Méthode de dosage de la cholestérine libre et éthérifiée.

Hürtle (3), puis Hepner (4), ont donné des techniques pour faire cristalliser, et séparer ainsi la cholestérine éthé-

(1) A. Windaus, *Berich. d. deut. chem. Gesellsch.*, **42** (1) 1909, p. 238.

(2) Fourneau et Piettre, *Bull. soc. Chim.*, 1912.

(3) Hürtle, (*loc. cit.*, p. 51).

(4) Hepner, *Archiv. f. d. ges. physiol.*, **73**, 602, 1898.

rifiée : ce ne sont pas des méthodes quantitatives. Le procédé de Letsche (1), pour mettre en évidence la cholestérine libre dans le sérum de cheval, possède la même valeur.

Nous n'avons, à l'heure actuelle, qu'une seule méthode, capable de nous fournir des résultats certains : c'est celle de Windaus (2).

Comme nous l'avons déjà signalé, la digitonine est absolument sans action sur les éthers de la cholestérine ; elle permet d'isoler la cholestérine libre d'un mélange complexe de graisses et de lipoides. Elle représente donc, à l'heure actuelle, la seule méthode de dosage des cholestérines libre et éthérifiée.

Les expériences, dont nous exposons les résultats ci-dessous, ont été faites d'après le procédé de Windaus, en observant toujours les modifications que nous rapporterons en détail dans le chapitre VII.

Les premiers essais ont porté sur des mélanges synthétiques ; nous ne sommes passés à des applications sur l'extrait éthéré des sérums, qu'après avoir obtenu des résultats satisfaisants.

1. Combinaison entre la cholestérine et la digitonine (3)

0 gr. 055. Cholestérine + 0 gr. 30 digitonine (*) (en solution à 1 %)
 Complexe obt. = 0 gr. 229 ($0,229 \times 0,2431 = 0,055$ de cholest.).

(1) Letsche (*loc. cit.*, p. 51).

(2) Windaus (*loc. cit.*), et *Zeitsch. f. physiol. Chim.*, **65**, 110, 1910.

(3) Nous ne reproduisons pas à chaque expérience, les détails opératoires pour la formation du complexe. Ce sont toujours les mêmes et ils sont exposés en détails et discutés au chap. VII.

(4) Nous avons souvent employé, à dessein, un gros excès de digitonine pour prouver qu'il ne pouvait nuire.

Extrait obtenu par évaporation de la solution alcoolique, de l'alcool et de l'éther qui ont servi pour les lavages = 0 gr. 1255. La recherche de la cholestérine dans cet extrait est négative (Liebermann, xylol).

Le complexe est traité par le xylol bouillant pendant dix heures ; par évaporation du xylol, on obtient un résidu de 0 gr. 054, constitué par de la cholestérine bien cristallisée, identifiée par son point de fusion et la réaction de Liebermann. La digitonine, restée dans la douille, est bien séchée, puis dissoute dans l'alcool : elle redonne un complexe avec de la cholestérine, comme au début de l'expérience.

2. Indifférence de la digitonine vis-à-vis des éthers de la cholestérine.

0 gr. 05 de palmitate de cholestérine + digitonine 0 gr. 25.

L'addition d'eau ne détermine pas la formation de complexe ; par refroidissement, l'éther de cholestérine se précipite. On le reconnaît à sa solubilité dans l'éther.

3. La présence d'éther de cholestérine ne trouble pas la combinaison entre la cholestérine et la digitonine.

0 g. 023 Cholestérine + 0,052 palmitate de cholest. + 0. g. 30 digiton.

Complexe obten. = 0,095 ($0,095 \times 0,2431 = 0,023$ de choleste).

Par évaporation de la solution alcoolique, de l'alcool et de l'éther de lavage, on obtient 0 gr. 272, représentant la somme : Digitonine en excès + éther de la cholestérine.

0,023	0,0952
0,052	0,2720
0,300	
0,375	0,3672

4. La présence de lécithine n'influe pas sur la formation du complexe.

0,05 Cholestérine + 0,055 lécithine + 0,25 digitonine.

Complexe obtenu = 0 gr. 208 soit 0 gr. 0509 de cholestérine.

5. La combinaison se fait régulièrement dans un mélange synthétique analogue à l'extrait éthéré.

Palmitate de cholestérine	0,113
Cholestérine	0,0975
Lécithine	0,105
Trioléine	0,158
	0,4785

Ce mélange est dissous dans 15 c.c. d'alcool absolu, additionné de 0 gr. 50 de digitonine en solution alcoolique et de 4 c.c. 2 d'eau distillée.

Complexe obtenu = 0,405 soit 0,0984 de cholestérine.

6. Action de la saponification sur la digitonine.

La digitonine ne paraît pas être touchée par la saponification, dans les conditions, dans lesquelles nous nous trouvons pour nos dosages.

0 gr. 30 digitonine en solution alcoolique +

40 c.c. Soude alcoolique N/2,5 + 20 c.c. eau distillée.

Saponification trois heures au bain-marie bouillant.

L'alcool est distillé ; le résidu est dissous dans l'eau et acidulé légèrement. On agite avec l'éther. Après un long repos, on sépare la couche éthérée ; on l'évapore. Elle ne donne pas de résidu. On recueille sur un filtre les aiguilles cristallines qui se sont produites, au moment où la solution a été acidulée ; on les dissout, puis on évapore la

solution à sec et on reprend l'extrait par l'alcool bouillant.

Cette nouvelle solution alcoolique donne, avec une solution alcoolique de cholestérine, un précipité, qui est un complexe de digitonine-cholestérine.

La digitonine n'étant pas décomposée par la saponification, il était nécessaire de l'éliminer, pour pouvoir poursuivre notre analyse.

7. Essai d'élimination de la digitonine en excès, selon Windaus.

0 gr. 035 Cholestérine + 0,048 lécithine + 0,025 digitonine.

Complexe obtenu = 0,149, représentant 0,03 de cholestérine et 0,113 de digitonine.

Il reste donc à éliminer $0,250 - 0,113 = 0,137$ de digitonine.

On chasse une grande partie de l'alcool, on ajoute de l'eau, et on agite avec de l'éther. Après repos, celui-ci est séparé. On répète une deuxième opération. Par évaporation de la solution étherée, on obtient un résidu du poids de 0,039.

Les résultats sont donc peu satisfaisants.

8. Essai de précipitation de la digitonine en solution alcoolique par l'éther en excès.

5 c.c. de solution alcoolique de digitonine à 1 0/0 (exactement 0,0488) + 45 c.c. d'éther. On obtient dans trois expériences comme précipités :

0 gr. 0475

0 gr. 0480

0 gr. 0469

L'expérience est répétée en présence de lécithine : 5 c.c. d'une solution à 1 0/0 (exactement 0,052). On obtient 0,0485 de digitonine précipitée.

Extrait obtenu par évaporation de la solution : 0,053, représentant la lécithine (au lieu de 0,052). La précipitation est donc suffisamment rigoureuse.

9. Combinaison entre la cholestérine et la digitonine en présence de lécithine et élimination de l'excès de digitonine.

0,022 Cholest. + 0,053 lécithine + 0,152 digiton (15 cc. solut. à 1 %).

Complexe obtenu = 0,094.

Extrait obtenu par évaporation de la solution alcoolique, de l'alcool et de l'éther de lavage = 0,130.

L'extrait est redissous dans un peu d'alcool à 95° et précipité par un grand excès d'éther (a). On centrifuge, on décante et on évapore la solution éthérée (b). Le résidu pèse : 0 gr. 051 et présente tous les caractères de la lécithine (b). Le précipité (a) est soluble dans l'eau et présente les caractères de la digitonine.

Théorie		Résultats	
Cholestérine :	0,022	complexe :	0,094
Lécithine :	0,053		
Digitonine :	0,152	extrait :	0,130
	0,227		
			{ 0,0228 cholestérine. 0,0712 digitonine. 0,0510 lécithine. 0,0790 digiton. en excès (par différence).
			0,2240

10. Complexe obtenu sur un extrait éthéré.

Extrait éthéré : 0,402. Complexe obtenu : 0,214 (0,214 × 0,2431 = 0,052 de cholestérine).

Le complexe est épuisé six heures au xylol.

Par évaporation du xylol, on obtient 0 gr. 0507 de cholestérine au lieu de 0,052.

11. Formation de complexes sur un extrait éthéré.
Dosages des cholestérines libre et éthérifiée.

Un extrait éthéré est divisé en deux parties A et B.

A. extrait éthéré = 0,264 + digitonine 0,30.

Complexe obtenu = 0,163 représentant : cholestérine 0,0396 et digitonine 0,1234.

Les solutions concentrées sont précipitées par l'éther.

Digitonine en excès précipité	0,1865
Solution évaporée	0,187

Ce produit est saponifié ; il fournit : 0,160 d'acides gras + cholestérine.

On forme un nouveau complexe par addition de digitonine :

Acides gras + cholestérine : 0,160 + digitonine 0,20.

Complexe obtenu : 0,126 correspondant à cholestérine 0,0306 et à digitonine 0,0954.

Dans la formation du premier complexe, on avait mis : 0,30 de digitonine ; on en trouve : 0,1234 dans le complexe et on en précipite 0,1865, soit au total 0,3099 au lieu de 0,30.

Dans la formation du second complexe, on avait mis : 0,20 de digitonine ; on en trouve 0,0954 dans le complexe et on en précipite 0,112, soit au total : 0,2074 au lieu de 0,20.

Enfin, on doit théoriquement avoir en solution 0,1294 d'acides gras, on en trouve 0,1235.

Résultats pour le sérum étudié :

Cholestérine libre	0,0396
Acides gras + cholestérine libérée	0,160
Cholestérine libérée	0,0306

B. Extrait étheré : 0,264. On lui ajoute 0,05 de cholestérine et 0,40 de digitonine ; on obtient un complexe de 0,356.

Si on regarde comme théoriques les premiers résultats, on aurait dû obtenir :

	On obtient :	
Complexe	0,3680	0,3560
Cholestérine	0,0896	0,0865
Digitonine	0,2786	0,2695

On voit, qu'en opérant avec précautions, malgré le nombre des opérations, on peut obtenir des résultats très satisfaisants.

12. Formation de complexe sur un extrait étheré et essai d'élimination de la digitonine par évaporation à sec de la solution et reprise par l'éther anhydre.

Extrait étheré : 0,1735 + digitonine 0,18.

Complexe obtenu, 0,12, correspondant à 0,029 de cholestérine et à 0,0909 de digitonine.

Il reste donc à éliminer 0,0891 de digitonine en présence de 0,1444 d'extrait étheré.

On évapore la solution à sec ; on sèche l'extrait obtenu dix minutes à 100°. On l'épuise à cinq reprises par l'éther anhydre.

La solution étherée donne 0,094 d'extrait par évaporation.

Le produit insoluble dans l'éther est égal à 0,136.

On devait trouver : 0,1444 au lieu de 0,094, soit une perte de 0,0504 en extrait étheré ;

0,0891 au lieu de 0,136, soit 0,0469 de digitonine en trop.

Quelques essais ont paru nous montrer, que cette perte sur l'extrait étheré affectait particulièrement les lipoides phosphorés.

Donc le procédé est inapplicable.

CHAPITRE VI

MÉTHODES DE DOSAGE DES LIPOÏDES PHOSPHORÉS

Les méthodes les plus simples consistent à isoler la lécithine à l'état naturel, ou à l'engager dans des combinaisons déterminées. Nous avons déjà passé en revue ces procédés à propos du dosage des graisses proprement dites. Nous n'y reviendrons pas puisqu'ils ne peuvent pas servir à un dosage exact.

Comme on ne peut isoler la lécithine, il faut chercher à doser un des éléments qui caractérisent sa molécule. Dans le mélange de graisses et de lipoïdes extraits du sérum, l'azote et le phosphore lui sont propres.

Le dosage de l'azote est facile, mais il n'a peut-être jamais été employé dans ce cas. En effet, la lécithine en renferme relativement très peu, et, surtout, il est presque impossible d'éliminer toute trace d'impuretés azotées.

Aussi, c'est toujours par le dosage du phosphore, que l'on évalue la quantité de lécithine contenue dans un mélange de matières grasses. La reprise des extraits alcooliques par l'éther anhydre, nous l'avons dit, permet d'éliminer complètement la petite quantité de phosphates qui auraient pu passer dans l'alcool.

L'opération comprend deux temps : la minéralisation du produit organique, puis la formation d'une combinaison phosphorée susceptible d'être facilement isolée et pesée.

Minéralisation. — On emploie beaucoup pour la minéralisation, la fusion de la substance à analyser avec un mélange de carbonate et d'azotate de soude (1). On a objecté (2) à cette méthode, la possibilité de pertes de phosphore, par réduction des phosphates au contact du charbon formé et par volatilisation. En réalité, l'addition d'une quantité suffisante de mélange alcalin suffit pour éviter cette cause d'erreur. L'opération doit être conduite cependant avec précaution, car, pendant la carbonisation, si on chauffe trop vite, les corps gras crépitent, la masse s'enflamme, et il peut en résulter des pertes par projections.

Ch. Marie, Bordas et de Raczkowski (3), détruisent la matière organique par l'acide nitrique concentré et terminent l'oxydation par le permanganate de potasse.

Neumann (4), emploie l'ébullition avec un mélange d'acides azotique et sulfurique.

Fleurent (5) a conseillé le traitement par l'acide azotique, suivi de l'addition d'acide sulfurique et d'un peu de mercure.

Nous avons cherché à utiliser la méthode la plus simple

(1) Burow, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1897, p. 343; Stoklasa, *id.*, 1900, p. 425; Virchow, *Chem. Zeit.*, XXXV, 1911, p. 913; B. Moreau, *Thèse*, Fac. Med. Lyon, 1901; etc.

(2) Jean Dormane, *Annal. Chim. Analyt.*, 1912.

(3) Bordas et de Raczkowski, *C. R. Ac. Sc.*, CXXXIV, p. 1592; Ch. Marie, *C. R. Ac. Sc.*, 1899, p. 466.

(4) A. Neumann, *Arch. f. physiol.*, p. 208, 1907.

(5) Fleurent, *Bull. Soc. Chim.*, t. XXXIII, p. 101.

et la plus pratique pour les petites quantités de phosphore que nous avons à doser.

Nos essais ont porté sur le mélange de carbonate et d'azotate de soude et sur l'action de l'acide azotique concentré. Les dosages de phosphore ont été faits par précipitation à l'état de phosphomolybdate.

Poids de lécithine employé : 0,487 :

	Phosphomolybdate	lécithine
I. Mélange alcalin (en léger excès).	1,087	0,472
II. Mélange alcalin (en plus forte proport.) {	1,118	0,486
	1,103	0,479
III. Acide azotique concentré	1,114	0,484

Les petites pertes constatées dans le dosage I et dans le dosage II, peuvent être dues, dans le premier cas, à la très petite quantité de substance minérale ajoutée, dans le second cas, à une projection pendant la minéralisation.

Dans nos analyses, nous n'aurons pas d'ailleurs à minéraliser de la lécithine et des graisses, mais du glycérophosphate de soude mêlé à un peu de choline et de glycérine ; dans ce cas, l'opération se produit beaucoup plus régulièrement et la calcination demande un peu moins de précautions.

Dosage proprement dit. — Une fois la minéralisation terminée, il faut doser le phosphore. On peut opérer soit par pesée, soit par volumétrie.

1° *Par pesée.* — La méthode classique consiste à précipiter le phosphore par la mixture magnésienne et à effectuer la pesée à l'état de pyrophosphate de magnésie.

En présence d'oxyde de fer et d'alumine, il est préférable d'employer la précipitation par le molybdate d'ammoniaque ; le phosphomolybdate formé est ensuite trans-

formé en phosphate ammoniaco-magnésien, puis en pyrophosphate.

Pour déterminer facilement de très petites quantités de phosphore, on a pensé à utiliser le poids moléculaire considérable de la combinaison avec le molybdats d'ammoniaque, et on a étudié la possibilité de la pesée directe du phosphomolybdate obtenu.

On a proposé trois techniques :

a) Pesée du phosphomolybdate après lavage à l'alcool et à l'éther (1).

b) Pesée du phosphomolybdate après dessiccation du précipité à l'étuve à 100°.

c) Pesée de l'anhydride phosphomolybdique provenant de la transformation du phosphomolybdate (2).

Elles ont eu, toutes les trois, leurs critiques ; on a reproché notamment au produit desséché à 100° de présenter une composition inconstante (3). Cette question a été reprise plusieurs fois ; Villiers et Borg (4), en particulier, montrèrent en 1893, qu'en se plaçant toujours dans des conditions déterminées, on obtenait des résultats très satisfaisants (5).

Pour limiter nos expériences de contrôle, nous nous sommes attachés à étudier seulement la seconde tech-

(1) N. von. Lorenz, *Zeitsch. f. ang. Chem.*, **46**, 193 ; W. Plücker, *Zeitsch. f. ang. Chem.*, **48**, 715.

(2) Frésenius, *Traité de chimie analytique quantitative*.

(3) W. Eggertz, *Journal de chimie pratique*, **79**, 457, 1860 ; J. Boussingault, *Vergl. W. Stadel's jahresbericht über die Fortschritte der reinen Chemie*, **5**, 31, 1877 ; Carnot, *Annales des Mines*, 9^e série, **3**, 5, 1893.

(4) Villiers et Borg, *C. R. Ac. Sc.*, t. CXVI, 1893, p. 990.

(5) Voir encore à propos du dosage du phosphore des lécithines ; Schulze, *Chem. Zeitung*, 1908, p. 981 ; Collison, *Journal of biological Chemistry*, XI, avril 1912, n° **3**, p. 217 a 220.

nique : pesée du phosphomolybdate après dessiccation à 100°.

Nous avons entrepris une série de recherches dont le but était de déterminer :

1° Les volumes de réactif à employer pour précipiter les petites quantités de phosphore en présence, et de voir, si les proportions habituellement observées, convenaient ici.

2° L'importance de la quantité de mélange alcalin ajouté.

3° La valeur de la pesée à l'état de phosphomolybdate d'ammoniaque comparée à la pesée à l'état de pyrophosphate de magnésie, comme l'avaient fait Villiers et Borg, mais en opérant sur des quantités de phosphore beaucoup plus faibles. (Nous avons choisi des poids de lécithine analogues à ceux que nous rencontrons dans l'analyse du sérum.)

4° Si, en se plaçant dans le cas des analyses complètes, la multiplicité des opérations, l'hydrolyse et les extractions en particulier, n'entraînaient pas des pertes notables dans les dosages.

Les expériences ci-dessous répondent à ces diverses questions.

1° Choix des proportions de réactif à employer (1).

On opère sur une prise d'essai de solution de phosphate alcalin correspondant à 0,002 $P^2 O^5$. On la dilue à 10 c.c., 20 c.c. et 30 c.c. On emploie généralement le réactif dans

(1) Nous remercions M. Leboime, qui a bien voulu répéter de son côté ces expériences, et dont les résultats ont confirmé ceux que nous avions précédemment obtenus.

les proportions de 1/80 ou de 1/100 : soit ici 2 c.c.

Les résultats sont exprimés en phosphomolybdate d'ammoniaque.

10 cc.	20 cc.	30 cc.
0,0535	0,054	0,0350
0,0535	0,055	0,0365
0,0525	0,054	0,0395
0,0540	0,055	0,0420

Dans ces dosages, les précipités ont été séparés par la centrifugation.

Dans ceux qui suivent, nous avons employé la filtration au papier (filtres suédois).

10 cc.	50 cc.
0,0485	0,006
»	0,016
0,0490	0,007

La prise d'essai était la même, ainsi que la proportion de réactif.

Nous avons alors mis 4 c.c., puis 8 c.c. et enfin 12 c.c. de réactif, pour une dilution de 30 c.c.

4 cc.	8 cc.	12 cc.
0,0505	0,0545	0,0550
0,0505	0,0535	0,0550
»	0,0540	0,0546
0,0500	0,0538	0,0550

Il est donc nécessaire de proportionner les quantités de réactif molybdique à la dilution de la solution à doser. Nous nous sommes assurés qu'un excès ne pourrait être nuisible.

2° Importance de la quantité de mélange alcalin ajouté.

Poids de lécithine à doser : 0 gr. 01.

Mélange alcalin	Phosphomolybdate	lécithine
I. 0,04 de mélange	0,0230	0,0100
II. 0,50 »	0,0235	0,0102

Un léger excès de mélange ne cause donc pas d'erreur.

3° Pesée à l'état de phosphomolybdate d'ammoniaque et pesée à l'état de pyrophosphate de magnésie.

Pyrophosphate de magnésie	P ² O ⁵	Phosphomolybdate	P ² O ⁵
0,0353	0,0225	0,592	0,0221
0,0360	0,0230	0,603	0,0225
0,0354	0,0226	»	»
0,0348	0,0222	0,594	0,0222

Les résultats sont concordants.

Nous n'avons pu choisir une prise d'essai plus réduite, pour ne pas avoir à peser un poids trop faible de pyrophosphate de magnésie.

4° Influence de la multiplicité des opérations sur les résultats.

Dosage de lecithine, à l'état de pyrophosphate de magnésie : I, avec calcination directe, en présence de carbonate et azotate de soude ; II, après hydrolyse et calcination ultérieure.

	Pyrophosphate de magnésie	lecithine
Sans hydrolyse I	0,1283	0,944
Après hydrolyse II	0,1248	0,918

Mêmes expériences, mais avec dosages à l'état de phosphomolybdate.

	Phosphomolybdate	lecithine
Sans H I {	0,0230	0,0100
	0,0235	0,0102
Après H II {	0,0214	0,00930
	0,0212	0,00923

Sans H	I	{ 0,2135	0,0928
		{ 0,2115	0,0919
Après H.	II	{ 0,1978	0,0860
		{ 0,1985	0,0863
Sans H	I	0,0115	0,0050
Après H.	II	0,0113	0,0049

On peut donc admettre désormais, que cette méthode, si sensible et si exacte, convient spécialement pour le dosage des plus minimes quantités de phosphore.

Frésenius (1) a signalé enfin, le passage facile du phosphomolybdate d'ammoniaque au sel de baryum. Cette remarque peut être utilement employée dans les cas, où le précipité paraît devoir donner une pesée trop faible, car cette transformation double environ le poids du produit.

Le poids moléculaire du phosphomolybdate d'ammoniaque : $\text{PO}^4 (\text{NH}^4)^3 (\text{Mo O}^3)^{13} 3 \frac{1}{2} \text{H}^2 \text{O}$ étant de 1904, et celui du phosphomolybdate de baryum $\text{Ba}^{27} (\text{Mo O}^4)^{24} \text{P}^4 \text{O}^5 + 24 \text{H}^2 \text{O}$ étant de 8.113, il suffit de diviser ce dernier par 2,13, pour avoir le poids de phosphomolybdate d'ammoniaque, et par 4,94, pour avoir le poids de lécithine.

Le procédé est précis. Un précipité de phosphomolybdate d'ammoniaque, du poids de 0,046, est dissous dans un peu d'ammoniaque ; on ajoute de l'eau, puis une solution de chlorure de baryum, jusqu'à ce que la précipitation soit complète. On centrifuge, on décante et on lave ; on centrifuge de nouveau et on sèche le précipité à l'étuve. Nous avons obtenu 0 gr. 098, alors que le poids théorique est 0 gr. 099.

2° *Par volumétrie.* — Neumann (2), après avoir obtenu

(1) Frésenius, *Traité de chimie analytique quantitative*

(2) Neumann, *Arch. f. physiol.*, p. 208, 1907.

le précipité de phosphomolybdate dans des conditions très rapides, le lave et le dissout dans une quantité déterminée d'une solution de soude ; après avoir porté le liquide à l'ébullition, il titre l'excès d'alcali et en déduit par le calcul, le poids de phosphomolybdate, et par suite, celui du phosphore.

Nous n'avons fait que quelques expériences comparatives avec le dosage par pesée ; elles ne nous suffisent pas pour conclure.

On a voulu, enfin, faire le titrage du phosphate formé à l'aide de l'azotate d'urane. Nous n'insisterons pas sur cette méthode, qui ne convient pas pour des quantités de phosphore aussi petites que celles qui proviennent des lipoïdes du sang.

Nous avons adopté la méthode par pesée du phosphomolybdate d'ammoniaque, après dessiccation à 100°, modifiée pour le cas particulier de nos dosages.

CHAPITRE VII

TECHNIQUE GÉNÉRALE ADOPTÉE

Avant de passer à l'exposé détaillé de notre méthode générale d'analyse, il nous faut dire quelques mots du dosage des savons.

Dans notre premier chapitre, nous avons vu que leur existence dans le sang, après avoir été assez discutée, avait été définitivement établie par Hoppe-Seyler ; il avait même donné, en 1884, une technique spéciale pour les extraire et les doser (1).

Depuis, nous les avons vu peu souvent mentionnés dans les méthodes d'analyse. Dans la saponification directe, ils sont décomposés par l'addition d'acide. Lorsqu'on enlève directement les matières grasses par un dissolvant, ils peuvent être, eux aussi, entraînés ; mais ils sont éliminés peu après, au cours des purifications par l'éther anhydre ou l'éther de pétrole, dans lesquels on a démontré leur insolubilité complète. C'est ce qui se passe dans notre technique générale.

Nous avons cependant voulu, dans quelques examens, nous rendre compte de leurs proportions. Après avoir

(1) Hoppe-Seyler (*loc. cit.*, p. 14).

épuisé par l'éther l'extrait alcoolique desséché et pulvérisé, jusqu'à ce que l'on n'obtienne plus de résidu par évaporation du dissolvant, nous avons repris la partie insoluble avec un peu d'eau tiède. La solution trouble a été filtrée et l'addition de quelques gouttes d'acide y a déterminé l'apparition d'un nouveau trouble, quelquefois même d'un précipité. Le mélange, agité avec de l'éther, est redevenu limpide, et la solution éthérée lavée et séchée, a laissé, par évaporation, un résidu d'acides gras. La quantité obtenue nous a paru, en général, assez faible (0 gr. 20 à 0 gr. 30 chez les individus normaux).

Comme ce dosage ne paraissait pas présenter pour le moment une réelle importance, nous l'avons habituellement négligé dans nos analyses.

1° Exposé détaillé de notre méthode de dosage des graisses et des lipoides dans le sérum sanguin.

Prise d'essai.

L'expérience nous a montré, que la quantité de sérum à employer, pour faire un dosage dans des conditions favorables, est de 20 c.c. Dans certains cas pathologiques, où l'on pense trouver une proportion de graisses notablement supérieure à la normale, on peut se contenter de 15 ou même de 10 c.c. Ce sont là des exceptions.

20 c.c. sont nécessaires, car, dans les cas habituels, ils permettent d'obtenir des pesées minimum de 0 gr. 02 à 0 gr. 03 ; au-dessous de ces chiffres, les causes d'erreurs seraient trop grandes. Ils doivent aussi être suffi-

sants, car il serait difficile d'obtenir une prise d'essai habituelle plus forte. Si, en effet, on désire faire des dosages en série chez des brightiques, ou encore étudier des sujets normaux ou anémiés, on comprend qu'on ne puisse demander à prélever plus de 50 c.c. de sang, qui fournissent à peu près 21 à 23 c.c. de sérum.

Nous avons préféré faire nos examens sur le sérum plutôt que sur le sang total, parce que on l'obtient beaucoup plus simplement, et parce que les dosages sont plus comparables entre eux.

I. — Extraction.

Nous avons choisi l'alcool à 95°, car des recherches comparatives avec l'alcool absolu, nous ont donné les mêmes résultats.

Le temps de contact à froid n'offre pas d'importance. La durée de l'extraction varie un peu, selon la quantité et la nature du sérum à traiter. En général, elle est complète au bout de quatre heures ; en la prolongeant de deux heures, on pourra satisfaire à tous les cas.

Le chauffage du ballon, qui renferme l'alcool, se fera très aisément au bain de sable ou sur une toile d'amiante. Il sera utile, pour assurer une ébullition régulière, de mettre dans l'alcool quelques morceaux de fil de platine ou de petits débris de verre.

Les matières albuminoïdes précipitées par l'alcool, seront recueillies sur une douille de Schleicher et Schüll, qui servira de filtre. Il sera utile de la laver d'abord à l'alcool bouillant. La nacelle de l'appareil de Kumagawa jouera le rôle d'entonnoir.

Les solutions alcooliques seront réunies et l'alcool sera distillé. On s'arrêtera, quand il ne restera plus dans le ballon que 30 centimètres cubes environ. Ce liquide sera transvasé encore chaud, dans une capsule plate de porcelaine ; on y joindra l'alcool de lavage et le tout sera évaporé au bain-marie. On achèvera la dessiccation de l'extrait obtenu, par un séjour de quelques heures à l'étuve à 50°. (Comme Kumagawa, nous avons adopté cette température, à laquelle les acides gras ne risquent pas de s'oxyder.)

Au sortir de l'étuve, le produit sera traité par l'éther anhydre (obtenu par distillation sur le sodium). Ce traitement sera répété jusqu'à ce que le liquide d'épuisement ne laisse plus de résidu. Les solutions éthérées réunies seront centrifugées dans des tubes à bec de 40 centimètres cubes environ.

Nous avons finalement adopté la centrifugation. En effet, lorsque l'on filtre sur papier ou sur coton dégraissé, on n'obtient que des résultats peu satisfaisants. Nous nous sommes longtemps servi du filtre d'amiante de Kumagawa.

Pour obtenir un filtrat limpide, l'amiante doit être bien tassée ; dans ce cas, la filtration est assez lente. Il se produit rapidement une sorte de colmatage du filtre, qui donne des produits mieux purifiés, mais peut retenir ainsi des graisses, que les lavages successifs à l'éther parviendront mal à enlever. Ce sont ces divers inconvénients, qui nous ont fait préférer la centrifugation. Avec elle, ils sont complètement supprimés, et les produits obtenus sont très purs.

Lorsque l'éther sera limpide, on le décantera dans une capsule tarée. Les tubes et les vases seront rincés avec une petite quantité d'éther, qui servira à épuiser les dépôts produits par la centrifugation.

Les liqueurs éthérées seront évaporées à basse température. On évitera les dangers d'inflammation, en utilisant le dispositif décrit par Kumagawa et Suto.

L'extrait éthéré obtenu sera séché à 50° et pesé. La connaissance de son poids donnera une idée approximative de la teneur en graisses, et indiquera plus tard, la quantité d'alcali nécessaire pour la saponification. Il contient à l'état brut la totalité des graisses neutres, des acides gras préexistants, des lipoides phosphorés et des cholestérines libre et combinée.

II. — Dosage de la cholestérine libre.

La première opération consiste maintenant à séparer et à doser la cholestérine libre, d'après la méthode de Windaus. Comme nous l'avons vu, elle repose sur la formation d'un complexe entre la cholestérine et la digitonine. Cette combinaison se produit dans le rapport de 1 à 3. La quantité de digitonine nécessaire est donc, théoriquement, trois fois celle de la cholestérine. Comme nous ne pouvons connaître celle-ci avant de l'avoir dosée, nous mettons un poids de digitonine égal à la moitié de celui de l'extrait éthéré. Cette quantité constitue, en général, un grand excès : nous nous sommes assurés qu'il n'était pas nuisible. Chez les ictériques, il est quelquefois nécessaire d'augmenter cette proportion.

La digitonine ne se dissout pas dans l'alcool à froid, et il faut porter le mélange à l'ébullition. Elle ne se dépose pas par le refroidissement. Elle est complètement insoluble dans l'éther, qui la précipite de sa solution alcoolique ; c'est pourquoi l'extrait éthéré ne devra pas être dissous dans l'éther, mais dans l'alcool à chaud.

Le complexe se forme à l'ébullition, en milieu alcoolique, et il se sépare par refroidissement. On emploie la digitonine en solution à 1 0/0. L'extrait éthéré est dissous dans 30 à 40 fois son poids d'alcool. Ces proportions doivent être exactement observées. Nous avons vu que dans le cas d'une dilution plus considérable, la précipitation était partielle ou nulle.

Le titre de l'alcool à employer varie avec les auteurs. Windaus fait la solution de digitonine dans l'alcool à 95°, et celle de l'extrait dans l'alcool à 90° ; Fraser et Gardner emploient uniquement l'alcool à 95°.

Nous avons parfois observé, qu'en suivant exactement la technique de Windaus, la précipitation ne se produisait pas complètement. Nous pensons qu'elle dépend un peu du rapport qui existe dans l'extrait éthéré entre la cholestérine libre et le reste des lipoides et des graisses. La séparation du complexe se produisant par la présence d'une petite quantité d'eau, nous avons essayé, sur le conseil de Mayer et Schæffer, de déterminer une modification physique plus brusque, en ajoutant l'eau, quand le complexe est déjà formé et quand la solution alcoolique est encore à l'ébullition. Nous avons obtenu avec cette modification des résultats très satisfaisants. En opérant ainsi, il est nécessaire de faire les deux solutions dans l'alcool absolu, pour que l'addition d'eau ne fasse pas tomber le titre alcoolique au-dessous de 95° ou de 90°.

Après une heure de repos, on sépare le précipité par centrifugation dans un gros tube taré ; on le lave soigneusement à l'alcool pour éliminer la digitonine en excès, puis à l'éther pour le débarrasser de toute trace de graisses et de lipoides. En opérant ainsi, il est plus facile de mettre

le complexe en suspension dans les dissolvants et la purification est plus complète.

On réunit toutes les solutions alcooliques. Elles contiennent, en plus des matières grasses, la digitonine en excès. Il faut l'éliminer, sinon, pendant la saponification, elle risquera de fixer la cholestérine libérée. La formation de ce nouveau complexe ne présenterait dans ce cas aucun intérêt, en raison des conditions dans lesquelles elle se serait produite.

Windaus évapore une partie de l'alcool, ajoute de l'eau au résidu, puis agite le tout avec de l'éther ; la digitonine passe en solution hydro-alcoolique, les graisses et les lipoides en solution étherée. Par suite de la présence d'alcool, la séparation, bien nette en apparence, n'est cependant pas assez satisfaisante. La couche étherée retient toujours un peu d'eau et d'alcool, la couche hydro-alcoolique un peu d'éther. Il en résulte une petite perte de matières grasses et la digitonine n'est pas complètement éliminée.

La technique de Fraser et Gardner ne donne pas de meilleurs résultats ; nous avons, en effet, remarqué que la dessiccation fait perdre des lipoides phosphorés.

Nous avons pensé à concentrer la solution alcoolique à un très faible volume, 20 c.c. au plus ; puis, avant qu'elle ne soit refroidie et que les graisses ne se précipitent, on la verse dans un grand excès d'éther, 100 à 150 c.c., auquel on ajoute les solutions étherées qui ont servi à laver le complexe. La digitonine, insoluble, se précipite ; les graisses et les lipoides restent en solution. Après une heure de repos, le liquide est décanté et centrifugé ; les précipités sont réunis et lavés plusieurs fois à l'éther. On distille les solutions étherées ;

leur résidu doit correspondre à l'extrait éthéré primitif, diminué de la cholestérine libre.

Ce procédé très simple ne modifie nullement les graisses et les autres lipoides.

III. — Saponification.

Nous pouvons maintenant opérer la saponification. Elle a lieu au bain-marie bouillant, en milieu alcoolique, et ne nécessite qu'une quantité relativement faible d'alcali. Les graisses se dissolvent à chaud dans l'alcool même un peu dilué, et leur décomposition est ainsi plus rapide. Nous employons la potasse en solution dans l'alcool à 70°, au titre N/2,5, à raison de 25 centimètres cubes pour 0 gr. 20 d'extrait éthéré. Schimidzu conseille une quantité bien plus importante d'alcali : nos expériences nous ont montré, que la proportion indiquée plus haut était non seulement suffisante, mais que l'excès, neutralisé par l'acide azotique, permettait la minéralisation complète du glycérophosphate et des matières organiques passées en solution aqueuse. Par précaution, on peut ajouter un peu de carbonate de soude pendant l'évaporation du liquide.

L'emploi d'un très léger excès d'alcali présente l'avantage d'augmenter la précision du dosage du phosphore. Villiers et Borg ont, en effet, observé, que la présence d'une certaine quantité de sels neutres diminuait un peu l'exactitude de la précipitation.

Enfin, en opérant au bain-marie bouillant et en condensant l'alcool à l'aide d'un réfrigérant, trois heures suffisent pour assurer la saponification complète des graisses et des lipoides.

On distille ensuite presque la totalité de l'alcool ; la solution aqueuse des savons, encore chaude, est traitée par un peu d'acide azotique dilué, qui libère les acides gras. Nous avons choisi l'acide azotique, parce que la précipitation du phosphomolybdate doit précisément se faire en milieu azotique. On réserve la couche aqueuse pour le dosage du phosphore.

Les liqueurs éthérées sont lavées avec de l'eau distillée pour enlever toute trace d'acidité, séchées et évaporées. Il est très important d'avoir une solution éthérée bien neutre. Nous avons remarqué, que si on acidule sans précaution et si on ne lave pas l'éther, celui-ci renferme un peu d'eau acidulée en solution. Quand l'évaporation sera presque terminée, les graisses se trouveront, à chaud en présence d'une solution relativement concentrée en acide nitrique ; elles s'oxyderont et donneront des produits insolubles dans l'éther anhydre et dans l'éther de pétrole.

Le résidu, laissé pendant une heure ou deux dans l'étuve à 50°, est purifié par l'éther anhydre, puis par l'éther pétrole. Après chaque opération, les solutions sont séparées par centrifugation et leurs extraits sont séchés à 50°. On élimine ainsi presque complètement les impuretés et les pigments.

Nous avons fait des distillations fractionnées d'éther de pétrole du commerce ; l'essai des diverses fractions obtenues nous a montré, que les meilleurs résultats étaient fournis par ce qui distille entre 40° et 60°. On peut se contenter, en pratique, de l'éther de pétrole rectifié commercial, qui passe entre 35° et 70°. Il faut surtout éviter la présence de carbures à point d'ébullition élevée.

Enfin, dans cette reprise par l'éther de pétrole, il faut en remuant doucement déterminer la solution de l'extrait,

puis abandonner au repos pendant une à deux heures. Les impuretés se séparent complètement et donnent un dépôt résineux adhérent au fond du vase (1).

Les solutions évaporées laissent un résidu d'acides gras et de cholestérine. On le sèche à 50° et on le pèse.

IV. — Dosage de la cholestérine libérée.

Pour en séparer la cholestérine libérée, on opère exactement comme pour la cholestérine libre. On peut également éliminer la digitonine en excès et isoler les acides gras bien purs. Généralement, on se contente de les évaluer par différence.

V. — Dosage des lipoides phosphorés.

Il ne nous reste plus qu'à donner quelques détails pratiques sur le dosage des lipoides phosphorés. Comme la solution aqueuse provenant de la saponification est parfois assez abondante, et comme aussi, il est préférable de l'évaporer dans le vase qui doit servir à la calcination, nous employons toujours un large creuset de Saxe. Le liquide est évaporé au bain-marie bouillant et le résidu séché à l'étuve à 100°. La calcination se fait très bien à la flamme d'un bec Bunsen ; on doit seulement chauffer un peu doucement au début. La minéralisation s'opère très tranquillement, sans projection et en quelques minutes. On laisse refroidir et on reprend la masse fondue avec un peu d'eau acidulée par l'acide azotique. On porte à l'ébulli-

(1) Peut-être se produit-il ici une légère perte d'acides gras et de cholestérine par entraînement ? Elle ne doit pas, en tous cas, être bien importante.

tion, pour assurer la dissolution complète des sels et pour chasser les produits nitreux qui auraient pu se former. Après refroidissement, la solution est filtrée et reçue dans un gros tube à centrifuger, taré, à fond plat. On lui ajoute, à l'aide d'un tube effilé pour éviter le mélange immédiat, du réactif de Sonnenschein, 10 à 20 c.c., selon la quantité présumée de phosphore et selon surtout le volume total du mélange. Après une heure de repos, on agite plusieurs fois le tube et son contenu. On le laisse ensuite pendant cinq heures à l'étuve à 40°. Le phosphomolybdate précipité est séparé par centrifugation; on le lave avec de l'eau renfermant 1/20 de réactif molybdique, puis avec un peu d'eau pure. On le sèche et on le pèse. En accomplissant toutes les opérations dans le tube taré, on évite de nombreuses causes d'erreur.

Nous avons terminé l'exposé de notre analyse générale, ou plus exactement, l'explication détaillée de toutes les opérations qu'elle comprend, même des plus simples. Avant de passer aux applications que nous lui avons données en physiologie et en pathologie, nous croyons utile de réunir dans un tableau schématique, la liste et la composition des principaux réactifs employés, la marche analytique proprement dite et les coefficients utilisés dans les calculs.

2° Tableau schématique.

A) Les principaux réactifs employés dans nos dosages.

Alcool absolu ; alcool à 95°.

Ether anhydre, distillé sur le sodium ; éther à 65°.

Digitonine Merck, en solution à 1 0/0 dans l'alcool absolu.

Potasse alcoolique N/2,5 dans l'alcool à 70°.

Ether de pétrole rectifié (35°-70°).

Réactif de Sonnenschein : dissoudre 150 gr. de molybdate d'ammoniaque dans de l'eau tiède, compléter à 1 litre avec de l'eau froide et verser cette liqueur dans 1 litre d'acide azotique de densité 1,20.

B) Marche analytique.

Prise d'essais : 20 centimètres cubes de sérum.

I. — Extraction.

20 c.c. sérum + 100 c.c. alcool à 95°.

Filtrer. Extraire à chaud avec 50 ou 60 c.c. alcool à 95°.
(Appareil de Kumagawa et Suto).

Distiller les solutions alcooliques ; s'arrêter vers 30 c.c.
Transvaser le liquide. Evaporer et sécher à 50°.

Epuiser le résidu à l'éther anhydre. Centrifuger. Décantier. Evaporer. Sécher. Peser.

Extrait éthéré = P.

II. — Dosage de la cholestérine libre.

Dissoudre P dans 50×P d'alcool absolu. Mêler avec une solution de digitonine à 1 0/0, q. s. pour avoir 1/2 P de digitonine. Faire bouillir. Ajouter de l'eau q. s. pour avoir un mélange alcoolique à 95°. Précipité. Repos. Centrifuger. Laver à l'alcool et à l'éther. Dessécher à 100°. Peser.

Complexe = C.

III. — Saponification.

Concentrer à 20 c.c. les solutions alcooliques ; mêler à 150 c.c. d'éther. Précipité. Centrifuger. Laver. Distiller les solutions étherées. Résidu + potasse alcoolique N/2,5 :

$$\left(\frac{P}{0,20} \times 25 \right).$$

Saponifier trois heures au B. M. Distiller. Aciduler. Enlever les acides gras et l'insaponifiable par l'éther. Laver l'éther, le sécher. Evaporer et sécher l'extrait à 50°. Reprendre (éther anhydre, puis éther de pétrole). Centrifuger. Sécher. Peser.

Acides gras + Cholestérine libérée = A. G.

IV. — Dosage de la cholestérine libérée (Comme en II).

V. — Dosage des lipoides phosphorés.

Evaporer la solution aqueuse. Dessécher. Minéraliser. Dissoudre dans l'eau acidulée. Faire bouillir, filtrer, précipiter (réactif de Sonnenschein : q. s. selon conditions). Centrifuger, laver, sécher, peser.

Phosphomolybdate = P. T.

C) Expression des résultats.

Cholestérine libre	C ¹ × 0,2431.
Cholestérine libérée	C ² × 0,2431.
Acides gras Totaux	A.G — (C ² × 0,2431).
Lipoides Phosp. (calc. en lécithine).	$\frac{P.T.}{2,3}$

Acides gras de la lécithine $\left(\frac{P.T.}{2,3}\right) 0,689.$

Acides gras des éthers de la cholestér. $(C^2 \times 0,2431) 0,73.$

Acides gras des graisses neutres et acides gras préexistants :

$$A.G - \left((C^2 \times 0,2431) 0,73 + \left(\frac{P.T.}{2,3}\right) 0,689 + C^2 \times 0,2431 \right).$$

CHAPITRE VIII

LES GRAISSES ET LES LIPOÏDES DANS LE SANG, AUX POINTS DE VUE PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE.

1° *Etat actuel de nos connaissances.*

Nous avons vu, au début de notre premier chapitre, que les graisses avaient été signalées dans le sang à la fin du *xviii^e* siècle. Depuis, on s'est efforcé de préciser leur nature, et on a cherché à les doser, de préférence dans les cas pathologiques où elles paraissaient particulièrement abondantes.

Les méthodes employées furent malheureusement peu rigoureuses et surtout peu comparables ; d'autre part, ces analyses ne portèrent que sur des cas isolés, en général très différents. Le diabète cependant a attiré assez fréquemment l'attention (1).

Le premier et le seul travail d'ensemble est dû à Bec-

(1) Neisser et Derlin, *Zeitsch. f. Klin. Med.*, 1904, **51**, p. 428 ; Klemperer et Ueber, *Zeitsch. f. Klin. Med.*, 1907, p. 145 ; Frugoni et Marchetti, *Berlin. Klin. Woch.*, 1908, **41**, p. 1844 ; G. Klemperer, *Deutsch. med. Woch.*, 1910, **36**, 2873 ; Adler, *Berl. Klin. Woch.*, 1910, **47**, p. 1453, etc.

querel et Rhodier (1) qui analysèrent le sang chez l'individu normal et chez des malades atteints d'affections très variées. L'insuffisance de leur méthode analytique enlève une grande partie de l'intérêt qui aurait pu s'attacher à leur mémoire.

Plus tard, Hoppe-Seyler (2), Abderhalden (3), etc., ont établi, avec des techniques meilleures, la composition du sang total, des globules et du sérum, dans la série animale.

Enfin, on a assez fréquemment étudié l'influence de la digestion et surtout de divers agents d'intoxication sur les variations des graisses du sang. Mentionnons, en dernier lieu, de rares analyses dans des cas de néphrites, de leucémie et de goutte.

Durant ces dernières années seulement, on a envisagé l'étude méthodique des lipoides dans diverses affections : la cholestérine, dans les maladies du rein, du foie, dans le typhus, les infections, la grossesse (Chauffard, Laroche et Grigaut (4)), (Neumann et Hermann (5)), dans la syphilis (Gaucher, Paris et Desmoulières (6)), dans le diabète (Apert, Péchery et Rouillard (7)) ; la lécithine, dans la syphilis, le cancer (Takemura (8)), la paralysie,

(1) Becquerel et Rhodier (*loc. cit.*, p. 8).

(2) Hoppe-Seyler (*loc. cit.*, p. 13).

(3) Abderhalden (*loc. cit.*, p. 13).

(4) Chauffard, Laroche, Ch. Richet et Grigaut, *Société de Biologie*, 7, 14, 21 janvier, 25 février, 4 mars, 1, 8 avril, 27 mai, 29 juillet 1911.

(5) Neumann et Hermann, *Wien. klinisch. Wochens.*, 23 mars 1911, n° 12, 412 à 417 ; *Biöch. Zeitsch.*, Bd. 43, p. 147, juil. 1912.

(6) Gaucher, Paris et Desmoulières, *Bull. Acad. Méd.*, 16 juillet 1912.

(7) Apert, Péchery et Rouillard, *Soc. Biologie*, 25 mai 1912.

(8) Takemura, *Biöch. Zeitsch.*, 1910, Bd. 25, p. 508.

le tabes (G. Péritz (1)), enfin dans de nombreux états pathologiques (Kimura et Steep (2)).

Toutes ces recherches sont très intéressantes, puisqu'elles apportent la connaissance de données nouvelles à la physiologie et à la pathologie. Elles se prêtent cependant à quelques critiques d'ordre général. Tout d'abord, elles sont souvent faites d'après des méthodes différentes et les résultats sont peu d'accord (Gérard et Grigaut par exemple). D'autre part, l'étude particulière d'un lipoiide peut conduire à des interprétations inexactes de son rôle biologique. En effet, les graisses et les lipoiides ont trop d'affinités, trop de rapports entre eux, pour que les études isolées puissent, une fois groupées, donner des résultats complets et sûrs.

Il nous a paru indispensable de pouvoir suivre leurs variations dans le même temps, sur la même prise de sang, chez le même malade.

C'est ce qui nous a amené à élaborer une méthode d'analyse complète, facilement applicable en pathologie.

Nous croyons qu'avec elle, si les recherches sont beaucoup plus longues et plus minutieuses, on obtiendra toutefois des résultats plus solides et plus généraux.

2° Résultats acquis par nos recherches.

Les études, que nous avons entreprises aux points de vue physiologique et pathologique ont été faites sous la

(1) G. Péritz, *Zeitsch. f. exp. path. u. therap.*, 5, 607.

(2) Kimura et Steep, *Deutsch. Arch. f. klin. Med.*, Bd. 114, p. 209, nov. 1911.

direction et dans le service de M. le Professeur F. Widal, avec la collaboration de M. le Dr André Weill (1).

Nous avons d'abord voulu établir la valeur totale et la répartition des graisses et des lipoides chez l'individu normal (2).

Sujets normaux à jeun. — Les examens ont porté sur le sérum de sujets sains, en dehors des périodes de digestion.

	Graisses neutres et acides gras (3) préexistants	Cholestérine	Lécithine
I	2 gr. 35 p. 1000	1 gr. 95	1 gr. 40
II	2 gr. 24 »	1 gr. 74	1 gr. 19
III	1 gr. 98 »	1 gr. 65	1 gr. 16
IV	2 gr. 17 »	1 gr. 68	1 gr. 15

On voit qu'à jeun, les individus normaux présentent des variations qui portent, d'une façon à peu près proportionnelle, sur les graisses neutres, la cholestérine, la lécithine.

Influence alimentaire. — On a signalé depuis longtemps l'existence de la lipémie (4) et l'apparition de la lactescence du sérum, après un repas riche en graisse. Nous avons cherché à préciser cette influence, en faisant absorber à des sujets que nous venions d'examiner à jeun, un repas composé de viande, de pommes de terre et de

(1) F. Widal, André Weill et M. Laudat, *Semaine médicale*, 6 nov. 1912; *Soc. Biologie*, 26 avril 1913.

(2) Nous remercions bien sincèrement M. le Dr André Weill de sa longue et obligeante collaboration.

(3) Calculés d'après les acides gras totaux avec déduction des acides gras des éthers de la cholestérine et de la lécithine.

(4) Le terme de *Lipémie* est employée pour désigner l'augmentation dans le sang, des matières grasses en général.

pain, additionnés de 50 grammes de beurre. Voici les résultats obtenus dans deux dosages comparatifs.

	GN + Ae.Gr.	Cholestérine	Lécithine
I { à jeun	2,35	1,95	1,40
I { après le repas	4,46	2,60	2,10
II { à jeun	2,24	1,74	1,19
II { après le repas	3,84	2,21	1,55

L'apport alimentaire, après l'absorption d'un repas riche en beurre, détermine donc l'augmentation notable de lipoides et des graisses. A jeun, comme en période digestive, on constate une tendance à l'équilibre entre les éléments de la lipémie.

Affections diverses. Les Brightiques. — Sachant comment était constituée la lipémie chez les sujets normaux, nous avons cherché ce qu'elle devenait chez les brightiques.

Nos études ont porté sur des malades atteints de mal de Bright, de formes les plus diverses. Nous les avons classés suivant les grands syndrômes qui dominaient chez chacun d'eux, pour rechercher si la lipémie affectait des rapports plus étroits avec l'un ou l'autre de ces syndrômes.

Albuminurie pure (sans chlorurémie, sans azotémie, sans hypertension).

	GN + Ae.Gr. (1)	Cholestérine
I	4,44	2,94
II	4,42	3,05

(1) Quand la lécithine n'a pu être dosée, ce qui est arrivé assez souvent pour des causes diverses, les graisses neutres et acides gras comprennent les acides gras de la lécithine.

Rétention chlorurée (sans rétention azotée).

	GN + Ac.Gr.	Cholestérine	Lécithine	Albuminurie
I	{ 18,40 16,28	10,80 10,40	— —	{ 25 gr. (néphrite tub.)
II	5,52	3,12	—	6 gr.
III	5,02	3,01	—	3 gr.
IV	2,73	1,94	—	traces
V	2,50	1,56	—	0,50
VI	2,25	2,85	2,58	4 gr.

Rétention azotée (sans lésion rétinienne).

	GN + Ac.Gr.	Cholestérine	Lécithine	Urée	Albuminurie
I	4,73	3,90	1,31	0,98	grosse albumin.
II	5,71	5,95	4,07	0,70	»
III	8,77	4,40	1,88 (I)	0,77	»
IV	5,42	3,24	—	0,91	»
V	6,86	5,60	—	0,66	»
VI	7,80	3,68	—	0,71	»
VII	5,11	3,03	—	2,22	
VIII	4,34	2,25	—	3,84	
IX	3,54	2,24	—	1,90	
X	—	2,17	—	1,43	
XI	—	2,05	—	2,09	
XII	—	2,25	—	1,16	
XIII	—	2,92	—	2,20	
XIV	{ — —	2,04 1,40	— —	1,41 4,41	

Rétention azotée (avec lésion rétinienne).

	GN + Ac.Gr.	Cholestérine	Lécithine	Urée
I	4,10	2,79	—	1,17
II	3,50	2,24	—	0,68
III	3,09	2,12	—	1,54
IV	5,17	2,47	—	0,95
V	5,17	3,07	—	1,42
VI	4,25	2,15	—	3,56

	GN + Ac.Gr.	Cholestérine	Lécithine	Urée
VII {	3,37	2,31	—	1,00
	2,45	1,96	1,07	2,98
VIII	3,55	2,13	—	1,90
IX	3,66	3,05	2,24	1,40
X	3,26	2,18	—	1,15
XI {	—	2,45	—	3,35
	—	2,30	—	3,55
	—	1,50	—	4,75

Hypertension et Albuminurie (sans chlorurémie, sans azotémie).

	GN + Ac.Gr.	Cholestérine	Urée	Coefficient d'Amard
I	2,73	1,60	0,33	0,083
II	—	1,90	0,36	0,08
III	2,89	1,69	0,30	0,079

Evolution de la lipémie chez un malade atteint de néphrite syphilitique avec légère azotémie, hypertension et grosse albuminurie.

Date	GN + Ac.Gr.	Cholestér.	Lécithine	Urée	Albumine du sérum
9 juin 1911 . .	5,71	5,95	4,07	0,70	53 g. 0/00
14 » . .	6,58	5,90	4,11	—	51 g. 70 0/00
19 » . .	10,49 (I)	5,54	4,26	—	44 g. 32 0/00
27 » . .	6,64	5,60	4,06	0,56	—
(Injections de 606 les 29 juin, 8 juillet, 6 août)					—
28 juillet 1911. . .	(pas de dosage de graisses).				—
	Δ : 0°,60 ; NaCl : 5 gr. 25 0/00				—
29 nov. » . .	6,17	3,55	3,74	0,56	—
6 déc. » . .	—	—	—	0,65	—
17 janvier 1912 . .	6,23	2,84	3,78	0,49	—
22 février » . .	7,20	2,59	2,21	—	—

De tous les symptômes du brightisme, c'est l'albuminurie qui paraît être le plus fidèlement liée aux grosses lipémies. Nous avons vu que nos grands lipémiques avaient

des albuminuries considérables, allant de 4 à 25 grammes. Trois d'entre eux étaient des tuberculeux à albuminurie massive, perméabilité rénale normale ou même exagérée hypotension artérielle et rétention chlorurée passagère. Dans cinq cas, il s'agissait de néphrites syphilitiques avec grosse hypertension, azotémie et chlorurémie. Chez les hypertendus avec albuminurie, sans azotémie ni chlorurémie, la lipémie était normale. Enfin, chez les brightiques œdémateux et chez les azotémiques, la cholestérine était augmentée, ainsi que l'avaient déjà vu M. Chauffard et ses élèves. Cette augmentation se montre surtout aux premiers stades de l'azotémie ; elle disparaît, en général, à mesure que le taux de l'urée du sérum s'élève.

Nos tableaux montrent que chez les brightiques l'augmentation de la lipémie est sensiblement parallèle à l'augmentation de la cholestérine. La cholestérine peut donc, chez le brightique, être considérée comme le reflet de la lipémie et en donner la mesure.

Par contre, la lécithine ne suit pas aussi fidèlement les variations de la lipémie.

L'hypercholestérolémie ne paraît pas avoir de relation étroite avec la rétinite ; on la rencontre, en effet, dans presque toutes les formes de néphrites. Chez les brightiques atteints de lésions rétiniennes, comme chez les autres azotémiques, elle ne fait que suivre les variations des graisses.

Influence alimentaire. — Enfin, nous avons repris chez les brightiques, la recherche de l'influence alimentaire.

Nos malades ont absorbé le même repas que nos sujets normaux. Nous avons obtenu dans deux dosages les résultats suivants :

	GN + Ac.Gr.	Cholestér.	Lécithine	Urée	Albuminurie
I { A jeun	4,73	3,80	1,31	0,98	gros. album.
{ Après le repas.	7,85	4,70	2,06	—	6 gr.

N. B. — Le dosage des acides gras des savons nous a donné chez ce malade, après le repas, 0 gr. 82 $\frac{1}{100}$.

II { A jeun	3,70	2,45	—	1,10	gros. album.
{ Après le repas.	5,74	3,08	—	—	3 gr.

L'ingestion d'un repas riche en beurre influe donc sur les divers éléments de la lipémie des brightiques tout comme chez les sujets normaux.

Le parallélisme que l'on observe chez les brightiques entre le taux de la cholestérine et celui des graisses, ne se retrouve pas toujours chez les sujets atteints d'autres affections. Ainsi, dans le sérum de sujets lithiasiques ou néoplasiques atteints d'ictère, nous avons trouvé une augmentation très forte de la cholestérine par rapport aux graisses.

Voici les cas les plus frappants que nous ayons observés :

	Acides gras totaux	Cholestérine	Acides gras des GN et de la lécithine (1)
I	22 gr. 50	15 gr. 50	11 gr. 19
II	9 gr. 28	8 gr. 16	3 gr. 32

En présence de résultats aussi surprenants, nous avons jugé nécessaire de vérifier, si, comme nous l'avions admis jusqu'ici d'après les expériences de Hürtle et de Hepner, la cholestérine existait dans le sérum seulement à l'état d'éther.

(1) C'est-à-dire, les acides gras totaux obtenus après saponification et dont on a déduit ceux qui appartiennent aux éthers de la cholestérine, en supposant que celle-ci existe tout entière éthérifiée dans le sérum des ictériques.

Nos premières recherches ont été faites d'après la technique de Hürtle. En examinant des sérums, appartenant à des individus normaux et à des brightiques, nous avons obtenu un produit cristallisé en deux formes différentes ; son point de fusion était inférieur à 100° et l'aspect des cristaux, complété par le point de fusion déterminé séparément sur chaque forme cristalline, nous a permis de les identifier avec l'oléate et le palmitate de cholestérine décrits par les auteurs. Par contre, chez deux malades atteints, l'un de lithiase biliaire, l'autre de cancer du pancréas, présentant tous deux un ictère par rétention très intense, nous avons pu isoler, en plus d'un peu d'éther de cholestérine, une proportion importante de cholestérine libre bien cristallisée.

Il existait donc des cas, dans lesquels le sérum renferme de la cholestérine libre à côté de cholestérine éthérifiée ; par suite, notre calcul des graisses neutres et des acides gras préexistants n'offrait plus une exactitude suffisante.

Après avoir soigneusement vérifié le procédé à la digitonine de Windaus, nous lui avons fait prendre place dans notre méthode générale, et nous avons pu reprendre ensuite une nouvelle série de recherches comparatives sur les cholestérines libre et éthérifiée dans le sérum des sujets normaux et des malades atteints d'affections diverses.

Chez l'individu normal, nous avons toujours pu déceler une faible proportion de cholestérine libre. Elle représente environ $1/4$ à $1/5$ du poids total de la cholestérine.

Chez les brightiques lipémiques, l'augmentation porte sur la cholestérine libre et la cholestérine éthérifiée dans des proportions sensiblement égales ; la cholestérine libre

constitue 1/4 à 1/5 environ du poids total de la cholestérine, comme chez les sujets normaux. En voici quelques exemples :

	GN + Ac.Gr.	Cholest. totale	Ch. éthérifiée	Ch. libre
I	3,86	2,18	1,72	0,46
II	4,08	2,23	1,59	0,64
III	3,95	2,16	1,61	0,55
VI	4,27	2,82	2,04	0,78

Chez plusieurs malades atteints d'ictère par rétention d'origines diverses, nous avons trouvé des proportions de cholestérine libre, augmentées souvent d'une façon considérable.

	GN + Ac.Gr.	Ch. totale	Ch. éthérifiée	Ch. libre	Lécithin.
I					
(ictère lithiasique)	7,59	6,96	0,92	6,05	6,89
II					
(ictère par cancer du pancréas)	6,33	3,60	0,63	2,97	—
III					
(kyste hydatique)	4,22	2,95	0,91	2,04	—
IV					
(ictère catarrhal)	4,24	2,80	1,22	1,58	1,05

La comparaison des deux tableaux montre toute la différence qui sépare la cholestérinémie des brightiques de la cholestérinémie des ictériques.

Pour compléter cette étude des graisses et des lipoides contenus dans le sérum des ictériques, nous avons entrepris une série de recherches sur leur passage dans le sang après absorption d'un repas riche en beurre, chez des animaux préparés et chez des malades. Nous en publierons sous peu les résultats (1).

(1) Voir à ce sujet un article de A. Lemierre et M. Brulé sur la lipémie alimentaire dans quelques ictères. *Bull. et Mém. de la soc. méd. des Hôpitaux*, 1910.

Parmi les malades atteints d'autres affections que nous ayons pu examiner jusqu'ici, nous ne citerons que les cas de xanthôme ; pour le diabète, la tuberculose, la syphilis, nous ne possédons pas encore un nombre suffisant d'observations.

Chez trois malades observés, nous avons obtenu des chiffres un peu différents. Deux de ces malades avaient une proportion de cholestérine faible par rapport au taux des graisses. Chez le troisième, au contraire, la proportion de cholestérine était plus forte. Dans les trois cas, la cholestérine libre atteignait environ le 1/3 de la cholestérine totale.

	GN + Ac.Gr.	Cholest. totale	Ch. éthérifiée	Ch. libre	Lécithine
I	37,82	5,58	3,44	2,14	4,40
II	25,57	6,43	3,98	2,45	5,02
III	4,28	5,22	3,53	1,69	2,06

Nous ajouterons, à titre de comparaison avec le cas de néphrite syphilitique précédemment rapporté, une série de dosages pratiqués chez le même malade, atteint de xanthôme généralisé.

Date	Ac.Gr. totaux + Chol. (1)	Cholestérine	Lécithine	Urée
4 décembre 1911 .	41,21	5,57	—	0,50
Février 1912. . .	44,03	—	3,27	—
» . . .	39,60	—	3,12	0,40
Mars . . .	48,12	5,96	—	—
Mai . . .	44,12	5,75	3,43	—
Novemb. » . . .	55,45	—	—	0,30

Le malade a été soumis pendant un mois à un régime très pauvre en matières grasses, sans pour cela qu'aucun

(1) Sous ce titre, nous comprenons le produit obtenu après extraction et saponification, sans élimination préalable de la cholestérine libre au moyen de la digitonine.

changement appréciable ne soit apparu dans son sang. Les deux dosages pratiqués en février, ont porté sur deux prises de sang faites à quarante-huit heures d'intervalle ; pendant ces deux jours, le malade avait observé un jeûne rigoureux : on voit que la quantité totale de matières grasses a diminué seulement d'un dixième (1).

Enfin, puisque la lactescence du sérum avait, par sa fréquence, déterminé les premières recherches de ce travail, nous devions chercher s'il existait un rapport constant entre la teneur en graisses du sérum et sa lactescence. M. Chauffard avait déjà noté la dissociation possible de la cholestérinémie et de la lactescence.

Nous avons constaté chez les brightiques que tout sérum lactescent est lipémique, mais que tout sérum lipémique n'est pas nécessairement lactescent. Les plus fortes lipémies observées chez des brightiques à sérum clair, étaient de 10 gr. 47 et de 9 gr. 52 d'acides gras totaux et cholestérine, pour des cholestérinémies de 3 gr. 05 et de 2 gr. 94.

Nous avons constaté encore, qu'il n'y a pas de rapport entre le degré de la lipémie et celui de la lactescence. C'est ainsi que chez un malade, nous avons trouvé un sérum opalescent avec une lipémie de 11 gr. 02 et un taux de cholestérine de 3 gr. 24. Deux jours plus tard, la lactescence du sérum était nettement plus accusée, alors que le dosage donnait pour la lipémie 9 gr. 63 et pour la cholestérine 2 gr. 91.

D'un sujet à l'autre, les différences sont encore beau-

(1) Voir l'observation détaillée de ce malade dans : *Bull. et Mém. de la soc. méd. des Hôpitaux*, séance du 15 nov. 1912. Legendre, E. Joltrain et Lévy-Frankel, *Xanthôme disséminé et généralisé avec chéloïdes secondaires*.

coup plus notables. Ainsi chez un malade, le sérum était lactescent pour une lipémie de 7 gr. 30 et une cholestérinémie de 2 gr. 15. Chez un autre, au contraire, le sérum était seulement opalescent pour une lipémie de 37 gr. 08 et une cholestérinémie de 10 gr. 80.

Notons aussi, que chez plusieurs sujets atteints d'ictère par rétention, le sérum, bien que contenant des taux très élevés de graisses et de cholestérine, était absolument limpide.

Le degré de la lactescence n'est donc pas en rapport direct avec le degré de la lipémie. La lactescence semble être conditionnée par la présence et la nature des graisses, puis par un état physique de ces corps dont il reste à préciser le déterminisme.

CONCLUSIONS

Avant d'aborder les conclusions de ce travail, nous voulons d'abord rendre hommage aux deux savants Kumagawa et Suto. Leur étude, très précise et très documentée, a facilité notablement nos recherches sur cette question du dosage des graisses, encore bien obscure avant eux. C'est, d'autre part, à l'aide de travaux de Windaus, que nous avons pu déterminer la valeur sensiblement exacte des graisses et de chaque lipoïde en particulier.

1° Au point de vue chimique :

Nous avons pu obtenir la totalité des graisses et des lipoïdes contenus dans le sérum par une simple extraction à l'alcool, en nous basant sur nos recherches, complétées par celles de Kumagawa et Suto.

Nous avons donné une technique détaillée, pour la saponification de l'extrait éthéré et la séparation de la cholestérine des acides gras.

Nous avons été amenés à préciser la méthode du dosage du phosphore des lipoïdes phosphorés, en raison

des conditions dans lesquelles nous nous étions placés.

Nous avons vérifié puis adapté la méthode de Windaus à notre technique générale, pour séparer la cholestérine libre de ses éthers. Nous avons donné un mode d'élimination simple et précis de la digitonine en excès.

2° Aux points de vue physiologique et pathologique.

Nous avons déterminé la quantité respective des graisses et des lipoides chez l'individu normal.

Nous avons étudié l'influence de l'alimentation sur les variations de ces divers éléments.

Nous avons montré que chez les brightiques, il n'existe pas seulement une *hypercholestérinémie*, mais aussi et surtout une *lipémie*.

Chez les ictériques, au contraire, nous avons mis en évidence le rôle prépondérant de la *lipoidémie*.

Chez les malades atteints de xanthôme, nous avons trouvé l'existence constante de *lipémie* dans les cas que nous avons pu examiner.

Nous avons apporté une distinction importante entre la cholestérinémie des brightiques et celle des ictériques en déterminant séparément les cholestérines libre et éthérifiée.

Nous avons pu présumer que la lécithine ne varie pas régulièrement comme les graisses et la cholestérine ; nous espérons par des dosages ultérieurs et l'étude d'autres affections, pouvoir établir plus nettement ses variations propres.

Enfin, en employant notre méthode, on pourra maintenant faire régulièrement en série chez des malades l'examen complet des graisses et des lipoides du sang, ce qui n'avait pu être réalisé jusqu'ici, soit par le manque d'une

méthode générale, soit encore parce que les quantités de sang nécessaires pour les dosages, interdisaient ces recherches en pathologie.

Vu, le Président de la thèse

GRIMBERT

Vu le Doyen

H. GAUTIER

Vu et permis d'imprimer

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris

LIARD

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.	1
CHAPITRE I. — Premiers essais sur la recherche et l'analyse des matières grasses du sang.	5
CHAPITRE II. — Nature et propriétés des graisses et des lipoides .	16
CHAPITRE III. — Méthodes d'extraction.	24
1. — Description des méthodes	25
2. — Discussion des méthodes	30
CHAPITRE IV. — Méthodes de dosage des graisses neutres et des acides gras	44
CHAPITRE V. — Méthodes de dosage de la cholestérine	52
CHAPITRE VI. — Méthodes de dosage des lipoides phosphorés . .	66
CHAPITRE VII. — Technique générale adoptée	75
1° Exposé détaillé de notre méthode de dosage des graisses et des lipoides dans le sérum sanguin	76
2° Tableau schématique	85
A. — Les principaux réactifs employés dans nos dosages	85
B. — Marche analytique	86
C. — Expression des résultats	87
CHAPITRE VIII. — Les graisses et les lipoides dans le sang, aux points de vue physiologique et pathologique .	89
1° Etat actuel de nos connaissances	89
2° Résultats acquis par nos recherches	91
CONCLUSIONS	103
1° Au point de vue chimique	103
2° Aux points de vue physiologique et pathologique	104

SAINT-AMAND, CHER. — IMPRIMERIE BUSSIÈRE
